

Aus der Klinik für Neurochirurgie
Direktor: Prof. Dr. Helmut Bertalanffy
des Fachbereichs Medizin der Philipps-Universität Marburg

in Zusammenarbeit mit dem Universitätsklinikum Gießen und
Marburg GmbH, Standort Marburg

**Genese und biologische Aktivität
cerebraler Kavernome
in adulten und pädiatrischen Patienten:
Eine immunhistochemische Studie von 87 Patienten**

Inaugural-Dissertation
zur Erlangung des Doktorgrades der gesamten Medizin
dem Fachbereich Medizin der Philipps-Universität Marburg
vorgelegt von

Sandra Maria Fremann, geb. Niemann
aus Münster

Marburg, 2006

Angenommen vom Fachbereich Medizin
der Philipps-Universität Marburg
am 21. September 2006.

Gedruckt mit Genehmigung des Fachbereichs

Dekan: Prof. Dr. Bernhard Maisch

Referent: PD Dr. Ulrich Sure

Korreferent: Prof. Dr. Pagenstecher

für

Andreas

und unsere Kinder

Noah und Mia

Inhaltsverzeichnis

1 Einleitung	7
1.1 Entstehung der Arbeit	7
1.2 Ziel der Arbeit	8
1.3 Grundlagen	9
1.3.1 Begriffsdefinition	9
1.3.2 Epidemiologie	10
1.3.3 Ätiologie	11
1.3.4 Klinische Symptomatik	11
1.3.5 Alter und Geschlecht	13
1.3.6 Lokalisationen	14
1.3.7 Wachstumsmechanismen	15
1.3.7.1 De Novo Entstehungen	16
1.3.7.2 Genetik und familiäre Fälle	17
1.3.7.3 Immunhistochemie	18
1.3.7.4 Radiatio	19
1.3.8 Diagnostik	20
1.3.9 Therapie	21
1.3.10 Prognose und Verlauf	22
1.4 Untersuchte Wachstumsfaktoren und Antigene	22
1.4.1 PCNA	23
1.4.2 MIB 1	24
1.4.3 Flk-1	24
1.4.4 VEGF	25
1.4.5 HIF-1 α	26
1.4.6 Endoglin	27
1.4.7 Tie-2	27
1.4.8 CD 31	28
2 Material und Methoden	29
2.1. Patienten- und Präparateauswahl	29
2.1.1 Klinische Patientendaten	29

2.2 Kontrollen	30
2.3 Immunhistochemie	31
2.3.1 Spezielle Protokolle	31
2.3.1.1 PCNA	32
2.3.1.2 MIB 1	34
2.3.1.3 Flk-1	34
2.3.1.4 VEGF	34
2.3.1.5 Hif-1 α	34
2.3.1.6 Endoglin	35
2.3.1.7 Tie-2	35
2.3.1.8 CD 31	35
2.4 Auswertung	36
2.4.1 Quantifizierung	36
2.4.2 Spezielle Antikörper	37
2.4.3 Schnittsystematik	37
2.4.4 Fotodokumentation	37
2.5 Statistische Methoden	37
3 Ergebnisse	39
3.1 Klinischer Teil	39
3.1.1 Epidemiologie / Patientenstatistik	39
3.1.2 Lokalisation	40
3.1.3 Blutungen / LCMOH	42
3.1.4 Symptomatik	43
3.2 Immunhistochemie	46
3.2.1 Pädiatrische Kontrollen	47
3.2.2 Pädiatrische Kavernome	48
3.2.3 Adulte Kontrollen	51
3.2.4 Adulte Kavernome	52
3.2.5 Korrelationen	57
3.2.5.1 Männliche vs. weibliche Patienten	59
3.2.5.2 Klinik adulter vs. IHC adulter Patienten	59
3.2.5.2.1 Krampfanamnese	59

3.2.5.2.2 Lokalisation	60
3.2.5.2.3 Blutungen / LCMOH	61
3.2.5.3 Pädiatrische vs. adulte Kavernome	62
3.2.5.3.1 Pädiatrische gesamt vs. adulte gesamt	62
3.2.5.3.2 Pädiatrische (0-5 Jahre) vs. adulte (>55 Jahre)	63
4 Diskussion	65
4.1 Klinische Aspekte	65
4.1.1 Epidemiologie	65
4.1.2 Klinische Symptomatik	66
4.1.3 Alter und Geschlecht	67
4.1.4 Lokalisationen	68
4.2 Experimentelle Aspekte	70
4.2.1 Untersuchte Antigene	70
4.2.1.1 Proliferations-assoziierte Antigene	70
4.2.1.2 Angiogenese-assoziierte Antigene	71
4.2.1.3 Zellkontakt-assoziiertes Antigen	74
4.2.2 Korrelationen	74
4.2.2.1 Männliche vs. weibliche Patienten	75
4.2.2.2 Klinik Adulte vs. IHC Adulte	75
4.2.2.2.1 Krampfanamnese	76
4.2.2.2.2 Lokalisation	77
4.2.2.2.3 Blutungen / LCMOH	78
4.2.2.3 Pädiatrische vs. adulte Kavernome	79
4.2.2.3.1 Pädiatrische gesamt vs. adulte gesamt	80
4.2.2.3.2 Pädiatrische (0-5 Jahre) vs. adulte (>55 Jahre)	82
4.3 Schlussfolgerungen	82
4.4 Ausblick	83
5 Zusammenfassung	85
6 Literaturverzeichnis	87

7	Verzeichnis der akademischen Lehrer	98
8	Danksagung	99

1 Einleitung

1.1 Entstehung der Arbeit

Die immunhistochemische Untersuchung von kavernen Hämangiomen (Kavernomen) des Zentralnervensystems bei Erwachsenen und in Gegenüberstellung bei Kindern ist das Thema der vorliegenden Arbeit. Durch die immunhistochemische Detektion relevanter Antigene in Paraffinschnitten von Kavernomen soll ein Beitrag zur Erforschung der Genese dieser Erkrankung geleistet werden.

In der neurochirurgischen Universitätsklinik Marburg liegt ein Tätigkeitsschwerpunkt in der mikrochirurgischen Behandlung cerebraler Gefäßfehlbildungen, insbesondere auch von Kavernomen. Vor allem die operative Behandlung von Kavernomen des Hirnstamms und anderer tiefliegender Hirnareale erfordern sehr große Erfahrung auf diesem Gebiet. Diese Erfahrung ist in Marburg verfügbar, was zu einer überregionalen Zuweisungspolitik bezüglich dieser eher seltenen Erkrankung führt. Bereits seit 1997 existiert in der neurochirurgischen Klinik in Marburg eine neurovaskuläre Arbeitsgruppe, die die relevanten Daten zu diesem außerordentlich interessanten Patientengut sammelt, katalogisiert und in entsprechenden Datenbanken archiviert. Die Neuropathologie Marburg besitzt ein großes Archiv mit paraffin-eingebettetem Material zu dem oben beschriebenen Patientenkollektiv. Die enge Kooperation zwischen der Neurochirurgischen Klinik und dem Institut für Neuropathologie in Marburg hat maßgeblich zum Entstehen der vorliegenden Dissertation beigetragen.

Verbindungen zu anderen europäischen Zentren, die sich ebenfalls schwerpunktmäßig mit der Behandlung kaverner Angiome beschäftigen, haben die Rekrutierung weiterer Kavernompräparate, insbesondere vieler pädiatrischer Fälle, ermöglicht. Durch das von der Universitätsklinik Zürich und der Universitätsklinik Würzburg freundlicherweise zur Verfügung gestellte Material konnte die hohe Fallzahl (56 adulte / 31 pädiatrische Kavernompatienten) der vorliegenden Studie erzielt werden.

Auf dem Gebiet der cerebralen Gefäßerkrankungen wurden in der Klinik für Neurochirurgie in Marburg neben den in der vorliegenden Arbeit behandelten Kavernomen auch Hirngefäßaneurysmen [Bertalanffy et al. 1998, Sure et al. 1999], spinale Gefäßmalformationen [Sure et al. 2000b] sowie arteriovenöse Malformationen (AVM) [Butz 2002, Sure 2002, Sure et al. 2001a] wissenschaftlich untersucht und diskutiert. In seiner Dissertation führt N. Butz immunhistochemische Bestimmungen verschiedener proliferations- und angiogeneseassoziiierter Antigene an einem kleinen Marburger Patientenkollektiv von 25 AVM- und 13 Kavernompatienten durch [Butz 2002]. Die hieraus hervorgegangenen Ergebnisse legten die Untersuchung größerer Patientenkollektive sowohl von AVMen [Sure 2002] als auch von Kavernomen nahe, wie in der vorliegenden Dissertation durchgeführt. Es wurden weitere Antikörper, die für die Genese dieser Gefäßfehlbildungen von Bedeutung sein könnten, in die Untersuchungen einbezogen.

In der vorliegenden Studie werden darüber hinaus adulte und pädiatrische Kavernome einander gegenübergestellt und bezüglich ihrer Klinik und ihrer immunhistochemischen Ergebnisse miteinander verglichen.

1.2 Ziel der Arbeit

Gegenstand der vorliegenden Dissertation ist die immunhistochemische Aufarbeitung der Operationspräparate von 56 adulten und 31 pädiatrischen Kavernompatienten. Dabei soll der Nachweis von proliferations-assoziierten und angiogenese-assoziierten Antigenen im Gewebe der untersuchten Läsionen geführt werden. Diesbezüglich bereits publizierte Ergebnisse sollen an einem größeren Patientenkollektiv und unter Einbeziehung neu etablierter Antigene verifiziert werden. Mögliche pathophysiologische Mechanismen, die zu einem Wachstum oder sogar zu einer Neuentstehung von Kavernomen beitragen können, sollen aufgedeckt und analysiert werden.

Besonderes Interesse gilt dabei dem Vergleich adulter und pädiatrischer Kavernome, sowohl in Bezug auf ihr immunhistochemisches Verhalten als auch auf ihre Klinik und die aus beiden zu erstellenden Korrelationen. So gewonnene

Erkenntnisse zur Ätiologie und Pathogenese der untersuchten Erkrankung beim Erwachsenen und beim Kind sollen auf ihre klinische Relevanz hin überprüft und vor dem Hintergrund aktueller Publikationen kritisch diskutiert werden.

1.3 Grundlagen

1.3.1 Begriffsdefinition

Kavernöse Angiome (Kavernome) gelten als umschriebene, benigne, vaskuläre Hamartome, die in Abhängigkeit von malformativen Mechanismen und hämodynamischen Gegebenheiten an Größe zunehmen können. Laut Lehrmeinung entstehen sie in einer frühen Phase der Embryogenese [Leu 1990, Notelet et al. 1997b, Rigamonti et al. 1991].

Kavernome bestehen aus unregelmäßigen dick- und dünnwandigen sinusoidalen Gefäßräumen, die ohne zu versorgendes benachbartes Hirngewebe im Gehirn liegen. Sie weisen einschichtige abgeflachte Endothelien auf, ohne glatte Muskulatur und elastische Fasern; sie sind durch fibröses und hyalinisiertes Gewebe voneinander abgegrenzt. Thrombosierungen, entzündliche Veränderungen, Proliferation von Granulationsgewebe, Kalzifikationen, Hämosiderose und Mineralisationen sind in diesen Läsionen relativ häufig nachweisbar [Bicknell et al. 1978, Bogren et al. 1970, McCormick 1966, McCormick 1984, Runnels et al. 1969, Russel et al. 1977, Zambramski et al. 1994]. Darüberhinaus kommen re-endothelialisierte intraläsionale Blutungen vor [Scott et al. 1992].

Der Kavernomdurchmesser weist eine enorme Bandbreite von weniger als 1 mm bis zu 10 cm auf, wofür es bislang keine Erklärung gibt. Die Mehrheit der klinisch symptomatischen Patienten hat Läsionen von über 1 cm Durchmesser [Bertalanffy et al. 2002]. Der Kavernomdurchmesser scheint bei Kindern mit durchschnittlich 6,7 cm größer zu sein als bei Erwachsenen mit einer durchschnittlichen Größe von 2-3 cm [Mottolese et al. 2001].

Versorgt werden Kavernome von zuführenden Arterien und drainierenden Venen. In etwa 8% der Fälle sind sie mit einer entwicklungsbedingten venösen Anomalie (DVA) vergesellschaftet [Rigamonti u. Spetzler 1988].

Große zystische Komponenten, die entweder organisierte alte Hämatome oder vergrößerte Kavernen darstellen, sowie komplexe oder überlappende vaskuläre Malformationen scheinen bei Kindern, besonders bei jüngeren, häufiger vorzukommen als bei Erwachsenen [Mottolese et al. 2001]. So berichten Mottolese et al. von pseudoangiomatösen Gefäßen, kapillären Teleangiektasien und/oder venösen Ektasien im das Kavernom umgebenden Parenchym bei den meisten Patienten von 3 Jahren Alter oder jünger [Mottolese et al. 2001].

1.3.2 Epidemiologie

Kavernome machen ca. 5-15% der vaskulären Malformationen des ZNS aus und sind somit die zweithäufigste cerebrovaskuläre Malformation.

Bereits 1990 berichteten Del Curling et al. [Del Curling et al. 1991] über ein häufigeres Vorkommen von Kavernomen als zuvor angenommen. Meist jedoch blieben diese Läsionen asymptomatisch. Die Inzidenzraten werden in der Literatur mit bis zu 0,7% der Gesamtbevölkerung angegeben [Del Curling et al. 1991, Detwiller et al. 1997, Robinson et al. 1991, Zambramski et al. 1994].

Ein familiär gehäuftes Auftreten der Erkrankung ist mehrfach dokumentiert [Siegel 1998, Bertalanffy et al. 2002]. Multiple Kavernome liegen bei über 60% der Patienten mit familiärer Anamnese vor [Siegel 1998]. In der zweiten Generation, in der Kavernome auftreten, konnte das Phänomen der Antizipation beobachtet werden, d.h. es kommt zu einem früheren Symptombeginn und zu einem schwereren Krankheitsverlauf [Siegel et al. 1998a, Siegel et al. 1998 b, Bertalanffy et al. 2002]. Etwa ein Viertel aller dokumentierten Läsionen treten in der pädiatrischen Altersgruppe auf [Mottolese et al. 2001, Bertalanffy et al. 2002].

1.3.3 Ätiologie

Ätiologisch unterscheidet man eine hereditäre [Haymann et al. 1982] und eine sporadische Form der Kavernomerkrankung. Bei dem hereditären Typ ist ein autosomal-dominanter Erbgang mit unterschiedlicher Expressivität nachgewiesen [Fobe et al. 1996, Lejeune et al. 1989].

Für die de novo Genese von Kavernomen wird ein Zusammenhang mit cranialer Radiatio postuliert. Insbesondere bei Kindern wirkt Bestrahlung mutagen [Gaensler et al. 1994]. Aktuelle Studien bestätigen einen Zusammenhang zwischen einer Strahlentherapie des Kopfes, besonders im Kindesalter, und dem Auftreten von cerebralen Kavernomen im Bestrahlungsfeld nach Latenzzeiten von 3 bis zu 41 Jahren [Duhem et al. 2005, Jain et al. 2005]. Tierexperimentell konnte eine Kavernominduktion durch das Polyoma Virus nachgewiesen werden [Detwiller et al. 1997, Fobe et al. 1996, Gross 1970, Vandeputte 1969].

1.3.4 Klinische Symptomatik

Klinisch manifestieren sich Kavernome durch epileptische Krampfanfälle (38-60%), durch ein zunehmendes neurologisches Defizit (12-50%) und durch Blutungen (20-23%) [Del Curling et al. 1991, Giombini u. Morello 1978, Kondziolka et al. 1995, Lunsford et al. 1991, McCormick et al. 1968, Moriarity et al. 1999, Robinson et al. 1991, Robinson et al. 1993, Zambramski et al. 1994, Zimmerman et al. 1991]. Hirnstammkavernome verursachen häufiger Hirnnervenausfälle als in anderen Lokalisationen gelegene Läsionen [Del curling et al. 1991, Fahlbusch u. Strauss 1991, Fortuna et al. 1989, Gil-Nagel et al. 1995, Giombini u. Morello 1978, Kondziolka et al. 1995, Moriarity et al. 1999, Robinson et al. 1991, Robinson et al. 1993, Zambramsky et al. 1994, Zimmermann et al. 1991].

Die Angaben zu den Blutungsraten in der Literatur variieren von 0,25%/Jahr [Del Curling et al. 1991] über 0,7%/Jahr [Robinson et al. 1991] bis hin zu einer retrospektiven Rate von 1,3%/Jahr [Kondziolka et al. 1995]. Kondziolka et al.

[Kondziolka et al. 1995] kalkulierten in ihrer Studie zusätzlich spezifische Blutungsraten für Patientengruppen mit unterschiedlicher klinischer Symptomatik. Diese Autoren berechneten, dass Geschlecht, epileptische Anfälle oder Kopfschmerzen in der Anamnese keine zur Vorhersage der Blutungswahrscheinlichkeit relevanten Faktoren darstellen. Patienten mit bereits stattgehabten Blutungen weisen jedoch mit 4,5%/Jahr ein deutlich erhöhtes Blutungsrisiko auf gegenüber Patienten ohne vorheriges Blutungsereignis mit 0,6%/Jahr [Kondziolka et al. 1995].

Ebenso erscheint die Lokalisation der Läsion einen Einfluß auf die Blutungshäufigkeit zu haben. Eine mit bis zu 10,6% angegebene Blutungsrate bei tiefliegenden Kavernomen ist signifikant höher als die Raten für Läsionen in anderen Lokalisationen [Porter et al. 1997]. Cantu et al. konnten den gleichen Zusammenhang eines höheren Blutungsrisikos von tiefen Kavernomen gegenüber anderweitig lokalisierten Läsionen innerhalb der Mexicanischen Population nachweisen [Cantu et al. 2005].

Eine Kavernomblutung bleibt meist lokal begrenzt auf den eigenen Sinusoidalraum. Eine Gefäßruptur kann jedoch auch zu einer schweren Blutung führen, in deren Folge dann Thrombosierungen, Ausdehnung von zystischen Räumen, reaktive Gliose und Hämosiderinablagerungen vorkommen. Die eisenhaltigen Hämosiderinablagerungen haben epileptogene Wirkung [Lange et al. 1980, Reid et al. 1979, Willmore et al. 1978]. Robinson und Awad [Robinson u. Awad 1993] unterscheiden drei verschiedene Arten von Kavernomblutungen: die langsame Sickerblutung, die einen Hämosiderinring hinterläßt, die intraläsionale Blutung, die zu einer Größenzunahme der Läsion führt, und eine manifeste Blutung über die Läsion hinaus, die zu akuten Symptomen führt.

Nach bereits stattgehabten Blutungen, insbesondere bei jungen Frauen, ist die Rate an Nachblutungen deutlich höher als bei Patienten, die zuvor noch keine Blutung erlitten haben [Alexander et al. 1998]. Patienten, deren Kavernome einen Zufallsbefund darstellen, oder die ohne vorherige Blutung an Konvulsionen leiden, weisen eine sehr niedrige Blutungsrate auf [Del Curling et al. 1991, Robinson et al. 1991, Robinson et al. 1993].

Robinson et al. berichten, dass bei ihrer Untersuchung 86% der Blutungen bei Frauen auftraten mit einer besonderen Häufung im ersten Trimenon der

Schwangerschaft [Robinson et al. 1993]. Diese Feststellung führe zu der Frage nach endokrinen Faktoren, welche die Blutungsneigung beeinflussen. Bekanntermaßen kommt es im ersten Graviditätsstrimenon zu einer ausgeprägten Gefäßproliferation des Endometriums sowie zu gesteigerter Sekretion von humanem Choriongonadotropin (HCG), Progesteron und Östrogen [Robinson et al. 1991, Robinson et al. 1993, Wilkins 1985]. Das Auffinden von Östrogenrezeptoren in einigen Kavernomen weiblicher Patienten unterstützt die Annahme eines Hormoneinflusses auf die Blutungsneigung [Porter et al. 1999].

Bestrahlungsinduzierte Kavernome zeigen eine häufigere Tendenz zur Größenzunahme und neigen zu häufigen Blutungen [Detwiller et al. 1998, Pozzati et al. 1996b].

Pädiatrische Kavernome weisen ebenfalls eine hohe Variabilität der gleichen Symptome auf, im Unterschied zu adulten Kavernomen liegt die Blutungsinzidenz bei Kindern, die auf 36 – 78% der symptomatischen Fälle geschätzt wird, jedoch deutlich höher [Mottolese et al. 2001]. Mottolese et al. weisen darauf hin, dass pädiatrische Kavernome neben AVMen eine von zwei Hauptursachen für intracerebrale Blutungen darstellen, und dass andere Blutungsursachen in zuvor gesunden Kindern wesentlich seltener vorkommen [Mottolese et al. 2001].

1.3.5 Alter und Geschlecht

Die Altersspanne für die Diagnosestellung von Kavernomen reicht von Neugeborenen bis in die neunte Lebensdekade hinein, mit einem Median von etwa 34 Jahren [Robinson u. Awad 1993]. Die größte Inzidenz scheint zwischen dem dritten und fünften Lebensjahrzent aufzutreten [Hsu et al. 1993]. Pädiatrische Fälle haben einen Anteil von etwa einem Viertel an der Gesamtinzidenz [Di Rocco et al. 1996, Hsu et al. 1993, Maraire u. Awad 1995, Mottolese et al. 2001].

Bei pädiatrischen Kavernomen gibt es zwei Altersgipfel für ihre Inzidenz, wobei die Gründe für diese bimodale Verteilung noch unklar sind. Mit einer geringen

Variabilität berichten mehrere Autoren von einem ersten Peak im frühen Kleinkindalter bis zum dritten Lebensjahr und einer weiteren Häufung von Fällen ab dem elften Lebensjahr bis in die Pubertät (16. LJ) hinein [Mottolese et al. 2001].

Obwohl einige Publikationen eine geringfügige Bevorzugung des männlichen [Giombini u. Morello 1978] oder weiblichen Geschlechts [Simard et al. 1986, Vaquero et al. 1987] für das Auftreten von Kavernomen sehen, geht die Mehrzahl der Studien mit großen Fallzahlen davon aus, dass die Geschlechtsverteilung bei dieser Erkrankung ausgeglichen ist [Del curling et al. 1991, Hsu et al. 1993, Porter et al. 1997, Robinson et al 1991, Sage et al 1993].

1.3.6 Lokalisationen

Das Vorkommen von Rückenmarkskavernomen ist nicht ganz so selten wie vor der MRT-Ära vermutet [Cosgrove et al. 1988, Lee u. Spetzler 1990, Pagni et al. 1990, Zevgaridis et al. 1999]. In der pädiatrischen Altersgruppe stellen Rückenmarkskavernome jedoch eine absolute Seltenheit dar [Bakir et al. 2006], sie manifestieren sich klinisch zumeist erst in der dritten oder vierten Lebensdekade [Mottolese et al. 2001].

Hahn fand in einer Serie von 1361 Kavernomfällen einen Anteil an spinalen Kavernomen von 5,5% [Hahn 1999]. Der größte Anteil der cerebralen Kavernome ist supratentoriell lokalisiert [Bertalanffy et al. 1991, Bertalanffy et al 1992, Hahn 1999, Maraire u. Awad 1995, Rosahl et al. 1998, Vaquero et al.1987, Voigt u. Yasargil 1976]. Ein Anteil von etwa 26% befindet sich infratentoriell [Hsu et al. 1993] mit den Prädilektionsstellen Pons (26%), Cerebellum (17%), Mittelhirn (12%) und Medulla (8%) [Bertalanffy et al. 2002]. Eine bevorzugte Hemisphere bezüglich der Lokalisation scheint es nicht zu geben [Hahn 1999]. Bestrahlungsinduzierte Läsionen liegen meist oberflächlich an der Grenze zwischen weißer und grauer Substanz [Pozzati et al. 1996b].

Porter et al. weisen auf die Wichtigkeit der Lokalisation zur Vorhersage einer klinischen Verschlechterung hin [Porter et al.1997]. Die Prognose tiefliegender Kavernome ist dabei ungünstiger, da die funktionellen Bahnen in den tiefen

Regionen enger gebündelt verlaufen, und somit bereits kleinste Veränderungen gravierende Folgen haben. Ebenso seien strukturelle Unterschiede im neuronalen Gewebe denkbar, die zu unterschiedlicher Aktivität der Kavernome führen. Des Weiteren könnte ein Druckunterschied durch eine unterschiedliche venöse Drainage oberflächlicher und tiefliegender Läsionen Änderungen in tiefer gelegenen Kavernomen beschleunigen [Porter et al. 1997].

Die Lokalisationen cerebraler pädiatrischer Kavernome scheinen generell mit denen adulter Läsionen vergleichbar zu sein. Jedoch seien tiefe Lokalisationen in Basalganglien, Hypothalamus oder dem Ventrikelsystem weniger frequent, Hirnstammlokalisationen mit der Prädilektionsstelle Pons aber etwas häufiger bei Kindern als bei Erwachsenen [Mottolese et al. 2001].

1.3.7 Wachstumsmechanismen

Bereits 1928 berichten Autoren über das Wachstumspotential von Kavernomen. Diese Wachstumstendenz wurde später von vielen anderen Autoren bestätigt und für bis zu 38% der Patienten mit intracraniellen Läsionen postuliert [Bertalanffy et al. 2002].

Bei Kavernomen geht man zwar nicht von einer Größenzunahme durch mitotische Aktivität wie bei echten Neoplasmen aus [Harrison et al. 1995]; die zugrunde liegenden pathogenetischen Wachstumsmechanismen sind jedoch bislang nicht komplett verstanden, und es werden von unterschiedlichen Autoren verschiedene Wachstumsmechanismen angenommen [Bertalanffy et al. 2002].

Eine extraläsionale Blutung könnte eine akute Vergrößerung und einen akuten Masseneffekt bedingen [Zimmerman et al. 1991], ebenso könnten wiederholte intraläsionale Blutungen und Thrombosen zur Ausdehnung einer hämorrhagisch bedingten zystischen Höhle führen [Pozzati et al. 1996a].

Chronische Blutungen könnten durch Organisation eines entstandenen Hämatoms zum Wachstum neuer Blutgefäße führen [Maraire et al. 1999, Pozzati et al. 1996a, Scott et al. 1973], oder Hämosiderinablagerungen im

umgebenden Gewebe mit reaktiver Gliose verursachen [Del Curling et al. 1991, Pozzati et al. 1996a, Simard et al. 1986, Zimmermann et al. 1991].

Immunhistochemisch wurde bereits der Nachweis echter Proliferation anhand von im Gewebe exprimierten proliferations-assoziierten Antigenen erbracht [Notelet et al. 1997b, Sure et al. 2001a, Sure et al. 2005].

Des Weiteren werden sogenannte hämorrhagische angiogenetische Proliferation durch Kapillarsprossung als reaktive Angiogenese [Maraire et al. 1999, Pozzati et al. 1996a], die Organisation intraluminaler Thrombosen [Tomlinson et al. 1994], sowie echte Vergrößerung des Kavernomnidus durch Formation und Anlagerung neuer kavernöser Gefäße [Fritschi et al. 1994, Little et al. 1990] und einige weitere Mechanismen für die Größenzunahme von Kavernomen verantwortlich gemacht [Bertalanffy et al. 2002].

Aktuelle Publikationen sowohl über De Novo Entstehungen als auch über immunhistochemische Untersuchungen von Endothelien der Läsionen führen zu der Hypothese, dass Kavernome eher als langsam wachsende vaskuläre Neoplasmen als als echte entwicklungsbedingte vaskuläre Malformationen klassifiziert werden sollten [Bertalanffy et al. 2002].

1.3.7.1 De Novo Entstehungen

Seit Ende der achtziger Jahre gibt es in der Literatur Berichte über neu aufgetretene Kavernome sowohl nach therapeutischer Radiatio [Alexander et al. 1998, Detwiller et al. 1998, Duhem et al. 2005, Gaensler et al. 1994, Jain et al. 2005, Larson et al. 1998, Maraïre et al. 1999, Pozzati et al. 1996b] als auch ohne vorhergegangene Bestrahlung [Abdulrauf u. Awad 1998, Detwiller et al. 1997, Fender et al. 2000, Fukui et al. 1998]. Diese klinischen Berichte über De Novo Entstehungen von strahlen- und nicht strahleninduzierten Kavernomen bei familiären und sporadischen Fällen werfen die Frage auf, ob diese Erkrankung entwicklungsbedingt oder erworben ist, und ob diese Läsionen eine proliferative und/oder neoplasische Kapazität innehaben [Bertalanffy et al. 2002].

Prädisponierende Faktoren für einen aggressiven Krankheitsverlauf mit Läsionswachstum, De Novo Genese und rezidivierenden Blutungen sind Schwangerschaft, stattgehabte Radiatio, inkomplette Operation, tiefe Lokalisation, assoziierte venöse Malformationen und die familiäre Erkrankungsform [Pozzati et al. 1996a].

1.3.7.2 Genetik und familiäre Fälle

Siegel et al. stellten 1998 eine Serie von 109 Familien mit mindestens zwei betroffenen Familienmitgliedern vor [Siegel 1998, Siegel et al. 1998a, Siegel et al. 1998b]. Diese Familien beinhalteten 431 Kavernompatienten mit bis zu vier betroffenen Generationen innerhalb einer Familie. Klinische Daten waren von 379 erkrankten Personen verfügbar, von denen 91 (24%) bei Diagnosestellung asymptomatisch waren. Bei denjenigen, die bereits Symptome aufwiesen, hatten 43% epileptische Anfälle, 28% Massenblutungen, 23% chronische Kopfschmerzen und 15% fokale neurologische Defizite. Bei einer Mehrheit von 69% der Patienten wurden multiple Läsionen diagnostiziert. Es traten jedoch auch einzelne Läsionen auf.

Ähnliche Daten wurden von der International Familial Cavernous Angioma Study (IFCAS) group in der bisher größten Serie von 131 Familien erhoben. Die Rate an Patienten mit multiplen Läsionen lag hier bei 62% [Bertalanffy et al. 2002].

Ebenfalls Siegel et al. beschrieben das Phänomen der Antizipation für familiäre Kavernomerkrankungen mit der Annahme, dass Trinucleotid Wiederholungen an den genetischen Vererbungsmechanismen beteiligt sein könnten [Siegel et al. 1998a, Siegel et al. 1998b]. Antizipation ist für viele neurodegenerative Erkrankungen (z.B. Morbus Huntington) mit sogenannten instabilen Trinucleotid Wiederholungen bekannt [Fraser 1997, McInnis 1996]. Anhand von Genanalysen betroffener Familien hat man eine verantwortliche Mutation auf dem langen Arm von Chromosom 7 entdeckt [Dubovsky et al. 1995, Günel et al. 1995, Johnson et al. 1995]. Bei den familiären Erkrankungen handelt es sich um einen autosomal dominanten Vererbungsmodus mit hoher aber inkompletter

Penetranz [Fobe et al. 1996, Steichen-Gersdorf et al. 1992]. Dubovsky et al. identifizierten 1995 das erste Gen für familiäre Kavernome an der Stelle 7q11-22 [Dubovsky et al. 1995]. Diese Entdeckung wurde von mehreren anderen Gruppen bestätigt [Günel et al. 1995, Günel et al. 1996, Johnson et al. 1995, Marchuk et al. 1995, Notelet et al. 1997a, Polymeropoulos et al. 1997]. Anschließend wurden noch zwei weitere Genorte für diese Erkrankung auf den Chromosomen 7p15-13 und 3p 25.2-27 identifiziert [Craig et al. 1998].

Viele Familien weisen eine Koexistenz von Kavernomen des ZNS und anderen Organen, z.B. der Haut oder der Retina, auf. Es bleibt bislang ungeklärt, ob die verschiedenen Lokalisationsmuster jeweils eine eigene Entität darstellen, oder ob es nur eine einzige Entität mit unterschiedlichen Lokalisationen gibt. Studien weisen jedoch auf eine gemeinsame genetische Grundlage hin [Labauge et al. 1999].

1.3.7.3 Immunhistochemie

Notelet et al. fanden 1997 in 85% ihrer Kavernomfälle eine positive endotheliale Immunodetektion für Proliferating Cell Nuclear Antigen (PCNA) [Notelet et al. 1997b]. Da PCNA ein Proliferationsmarker ist, schlossen sie aus ihren Ergebnissen, dass Kavernome dynamischere Läsionen darstellen als zuvor angenommen. In einer eigenen Studie konnten Sure et al. die vorgenannten Ergebnisse bezüglich PCNA bestätigen und fanden darüberhinaus einen immunhistochemischen Nachweis für MIB-1 in Endothelzellen von Kavernomen, während eine MIB-1 Expression in Kontrollpräparaten cerebraler Blutgefäße nicht nachgewiesen wurde [Sure et al. 2000a, Sure et al. 2001a, Sure et al. 2001b, Sure et al. 2005].

Als weitere Faktoren wiesen sowohl Kilic et al. als auch die eigene Arbeitsgruppe Vascular Endothelial Growth Factor (VEGF) und seinen Rezeptor Flk-1 sowie Basic Fibroblast Growth Factor (bFGF) und Transforming Growth Factor (TGF- α) [70] in Kavernompräparaten nach [Kilic et al. 2000, Sure et al. 2000a, Sure et al. 2001b, Sure et al. 2005].

Diese Ergebnisse demonstrieren die angiogenetischen Eigenschaften von Kavernomen [Bertalanffy et al. 2002, Sure et al. 2001a]. Die Resultate detaillierter Analysen zeigen, dass sich die Expression der vorbeschriebenen Angiogenesefaktoren nicht nur auf das Endothel beschränkt, sondern auch im Subendothel und im perivaskulären Gewebe von Kavernomen nachweisbar ist; sie weisen somit auf einen nicht allein vom Endothel ausgehenden Wachstumsmechanismus hin [Bertalanffy et al. 2002, Sure et al. 2001a, Sure et al. 2005].

1.3.7.4 Radiatio

Viele klinische Arbeiten beschreiben eine *De Novo* Genese von Kavernomen nach strahlentherapeutischer Behandlung und sprechen in diesen Fällen von strahleninduzierten Kavernomen [Alexander et al. 1998, Detwiller et al. 1998, Duhem et al. 2005, Gaensler et al. 1994, Jain et al. 2005, Larson et al. 1998, Maraire et al. 1999, Pozzati et al. 1996b].

Eine therapeutische Strahlenanwendung bewirkt Parenchym- und Gefäßveränderungen wie Ödem, Demyelinisierung, Gefäßschäden, Nekrose und Venookklusion. Nach diesen Vorgängen wird die Teleangiektasie als physiologischer Versuch, eine Kollateraldrainage zu schaffen, betrachtet. Andauernde venöse Okklusion führt zu venösem Hochdruck, Ischämie, Mikrohämorrhagien und der Sekretion von Angiogenesefaktoren [Gaensler et al. 1994, Pozzati et al. 1996b].

Insbesondere für pädiatrische Patienten ist Bestrahlung mutagen [Duhem et al. 2005, Gaensler et al. 1994, Jain et al. 2005]. Larson et al. berichten von sechs pädiatrischen Fällen von Kavernomen nach therapeutischer Radiatio wegen anderer neoplastischer Erkrankungen. In allen Fällen befand sich das Kavernom im Bestrahlungsfenster und war zuvor nicht bekannt (oder okkult), außerdem traten alle Läsionen nach einer Latenzphase von 4-10 Jahren auf [Larson et al. 1998]. Duhem et al. fanden Latenzzeiten von 4-22 Jahren [Duhem et al. 2005], während Jain et al. das Auftreten von cerebralen Kavernomen noch nach einem Intervall von 41 Jahren nach cranialer Radiatio dokumentieren

[Jain et al. 2005]. Möglicherweise handelt es sich bei bestrahlungsinduzierten Kavernomen um ein unterschätztes Problem, daher schlagen Duhem et al. MRT-Kontrollen für bis zu 15 Jahren nach cranialer Strahlentherapie vor [Duhem et al. 2005].

1.3.8 Diagnostik

Mit Hilfe verbesserter Bildgebung durch CT und insbesondere MRT werden Kavernome heute häufiger und früher als vorher diagnostiziert [Bertalanffy et al. 1992, Del Curling et al. 1991, Detwiler et al. 1997, Fortuna et al. 1989, Herter et al. 1988, Kondziolka et al. 1995, Porter et al. 1997, Pozzati et al. 1980, Pozzati et al. 1996b, Pozzati et al. 1996b, Rigamonti et al. 1987, Rigamonti et al. 1988, Robinson et al. 1991, Scott et al. 1992]. Vor der MRT-Ära betrachtete man sie als seltene Entität des Erwachsenenalters, während heute auch ihr Auftreten im Kindesalter dokumentiert ist [Fortuna et al. 1989, Mazza et al. 1991, Pozzati et al. 1980, Siegel 1998]. Die Bildgebung mittels MRT ist am besten zur Diagnostik geeignet [Bertalanffy et al. 2002, Bertalanffy et al. 1991, Rigamonti et al. 1987, Savoirdo et al. 1983, Vaquero et al. 1983], aber auch das Kontrast-CT wird zur Kavernomdiagnostik eingesetzt. Da sich Kavernome meist als angiographisch okkult darstellen, hat sich das Verfahren der Angiographie hier als nicht geeignet herausgestellt [Maraire u. Awad 1995, Vaquero et al. 1987, Voigt et al. 1976].

Auch pädiatrische Fälle werden am sichersten mittels MRT Bildgebung diagnostiziert, jedoch sollten auch CT Befunde nicht ignoriert werden, da die meisten Kinder mit cerebralen Kavernomen zunächst notfallmäßig einem CT unterzogen werden [Mottolese et al. 2001].

Pädiatrische Kavernome kommen in der MRT-Bildgebung etwas anders zur Darstellung als adulte, nämlich in der Regel mit einer sphärischen und regelmäßigen Form des das Kavernom umgebenden Hämatoms [Mottolese 2001].

1.3.9 Therapie

Patienten mit der gesicherten Diagnose eines cerebralen Kavernoms, die sich ohne Blutung, epileptische Anfälle oder andere spezifische Symptome präsentieren, sollten klinisch beobachtet und einer regelmäßigen Bildgebung (MRT) unterzogen werden [Bertalanffy et al. 2002]. Des weiteren wird die Operationsindikation bei Patienten mit familiären und multiplen Kavernomen sowie bei cardiopulmonal vorgeschädigten Patienten mit einer hohen zu erwartenden perioperativen Morbidität zurückhaltend gestellt [Kondziolka et al. 1995].

Patienten mit chirurgisch erreichbaren Läsionen, die fokale neurologische Defizite oder Blutungen aufweisen, sollten einer Operation unterzogen werden, sofern das Risiko der postoperativen Morbidität gering ist [Fahlbusch u. Strauss 1991], auch wenn es sich um anatomisch ungünstig gelegene Herde, z.B. im Hirstamm, handelt. Gleiches gilt für Patienten, die unter epileptischen Anfällen leiden [Bertalanffy et al. 2002]. Noto et al. haben in einer Studie das Outcome von Kavernompatienten mit epileptischen Anfällen in einer chirurgisch therapierten und einer medikamentös therapierten Gruppe miteinander verglichen. Sie haben einen signifikant größeren Benefit chirurgischer Intervention gegenüber medikamentöser Therapie festgestellt [Noto et al. 2005]. Die Therapieentscheidung wird durch die Beziehung des Kavernoms zur pialen Oberfläche des Gehirns, durch den neurologischen Status des Patienten und durch die Anzahl symptomatischer Episoden beeinflusst. Nach vollständiger Entfernung geht man von einer permanenten Heilung des Patienten aus [Zimmerman et al. 1991]. Tiefliegende (schwieriger zu operierende) Läsionen gehen laut Porter et al. mit einer deutlich erhöhten jährlichen Blutungsrate (10,6%) gegenüber superfiziellen Läsionen einher [Porter et al. 1997]. Ein ebenfalls erhöhtes Blutungsrisiko besteht nach vorausgegangenen Blutungen [Del Curling et al. 1991, Robinson et al. 1991, Robinson et al. 1993]. In diesen Fällen sollte die Operationsindikation großzügiger gestellt werden. Einer interventionellen endovaskulären Therapie sind Kavernome wegen ihrer extrem kleinkalibrigen zuführenden und abfließenden Gefäße nicht zugänglich [Bertalanffy et al. 2002].

Für die therapeutische Option der Radiochirurgie haben neuere Publikationen aufgezeigt, dass sich die stereotaktische Bestrahlung als ungeeignete Behandlungsmethode zur Prävention von Kavernomblutungen erwiesen hat [Karlsson et al. 1998, Mitchell et al. 2000, Pollock et al. 2000].

Die Operation ist somit die einzige zur Verfügung stehende kurative Therapie für Kavernompatienten, die eine dauerhafte Heilung und eine Ausschaltung des Blutungsrisikos ermöglicht [Bertalanffy et al. 2002].

Für pädiatrische Kavernompatienten gilt grundsätzlich das gleiche vorbeschriebene Therapiekonzept, jedoch sollte bei der Stellung einer Operationsindikation zusätzlich die höhere kumulierte Blutungswahrscheinlichkeit aufgrund des geringen Lebensalters mit berücksichtigt werden.

1.3.10 Prognose und Verlauf

Bertalanffy et al. berichten für ihre eigene Serie von 72 operierten Kavernompatienten über eine perioperative Morbidität von 29,2%, einer Langzeitmorbidität von 5,5% und keiner Mortalität. Diese Komplikationsraten stimmen mit anderen Veröffentlichungen über chirurgische Resultate bei Kavernomen überein [Bertalanffy et al. 2002].

Die meisten Patienten, auch mit Hirnstammprozessen, haben ein gutes Outcome [Alexander et al. 1998, Del Curling et al. 1991, Little et al. 1990, Robinson et al. 1991]. Auch in der pädiatrischen Altersgruppe haben verbesserte chirurgische Techniken und Anästhesiologie zu guten Resultaten der meisten operierten Kinder geführt [Mottolese et al. 2001].

1.4 Untersuchte Wachstumsfaktoren und Antigene

In der vorliegenden Studie sollten mit Hilfe der Immunhistochemie zwei bedeutende Mechanismen der Zellbiologie in den Operationspräparaten untersucht werden. Zum einen sollte Proliferation der normalerweise nicht

proliferierenden Endothelzellen des zentralen Nervensystems nachgewiesen werden. Hierzu wurden die proliferations-assoziierten Antigene PCNA und MIB 1 (Ki-67) immunhistochemisch detektiert. Zum anderen wurden die Präparate auf eine ebenfalls üblicherweise nicht vorkommende Angiogenese hin untersucht. Zu den angiogenese-assoziierten Antigenen zählen der Endothelmembranrezeptor Flk-1 und sein Ligand VEGF, die in der Angiogenese bedeutsamen Wachstumsfaktoren HIF-1 α und Endoglin sowie der Angiopoetinrezeptor Tie-2. Darüberhinaus wurden die Präparate auf das Vorhandensein eines zellkontakt-assoziierten Antigens, des Endothelzellmarkers CD 31, ein Zell-zu-Zell Adhäsions Glykoprotein, hin untersucht. Im folgenden werden die vorgenannten Antikörper zunächst einmal vorgestellt.

1.4.1 PCNA

PCNA, Proliferating Cell Nuclear Antigen, [Kirkegaard et al. 1998, Wolf u. Dittrich 1992] ist ein sogenanntes proliferations-assoziiertes Antigen, das bei positiver nukleärer Immunreaktion in der Mitosephase befindliche Zellen nachweist. Es handelt sich um einen Co-Faktor der DNA-Polymerase δ [Fairman 1990, Hall u. Woods 1990, Hall et al. 1990, Prelich et al. 1987], der in der Synthesephase mit DNA-Reparatur assoziiert ist. PCNA ist erforderlich für die Nukleotid Exzision aus der DNA [Jónsson et al. 1998]. Wachstumsfaktoren stimulieren und stabilisieren die Akkumulation von PCNA m-RNA und die Expression von PCNA-Protein. Die lange Halbwertszeit von 20 Stunden führt dazu, dass die Detektionsdauer über die Aktivitätsphase hinausgeht [Kubbutat et al. 1994b, McCormick u. Hall 1992].

PCNA ist diffus oder granulär im Nucleus mitotischer Zellen nachzuweisen, seltener ist auch eine zytoplasmatische Expression detektierbar, insbesondere in mitotischen Zellen mit aufgelöster Kernmembran. Der PCNA-Antikörper dient demnach dem Nachweis von Proliferation [Smetana et al. 1983].

Eine lineare Beziehung in der Expression von MIB 1 und PCNA ist dokumentiert [Hall et al. 1990, Rose et al. 1994], wobei PCNA etwa doppelt so häufig exprimiert wird wie MIB 1. Die PCNA-Expression in Endothelzellen von

cerebralen Kavernomen [Bertalanffy et al. 2002, Netelet et al. 1997b, Sure et al. 2001a] und cerebralen AVMen [Sure et al. 2001a, Sure et al. 2001b] ist nachgewiesen.

1.4.2 MIB 1

MIB 1 ist ein monoklonaler Antikörper, der ebenfalls Proliferation nachweist [Gerdes 1990, Gerdes et al. 1991, Kirkegaard et al. 1998, Verhuljen et al. 1989a, Verhuljen et al. 1989b]. Er detektiert das nukleäre Zellproliferations-assoziierte Ki-67 Antigen, das in allen aktiven Phasen des Zellzyklus exprimiert wird, im Unterschied zu PCNA nicht jedoch in der G₀-Phase (Ruhephase) [Sasaki et al. 1987, Wersto et al. 1988].

Es ist ein eng mit Chromatin assoziiertes großes Doppelprotein (345 kD, 395 kD) und enthält unzählige Wiederholungen (repeated elements) in seiner Sequenz. [Van Dierendonck et al. 1989, Verhuljen et al. 1989a, Verhuljen et al. 1989b].

Mit einer Halbwertszeit von weniger als 1 Stunde unterliegt das Protein einer relativ raschen Degradierung, d.h. die Anfärbbarkeit nimmt während der Ana- und Telophase schnell ab. In der Interphase ist es im Nucleolus detektierbar, in der Prophase im Nucleoplasma, in der Metaphase den Chromosomen assoziiert, und in der Telophase findet man es punktuell in Cytoplasma verteilt [Cattoretti et al. 1992, Gerdes et al. 1991, Kubbutat et al. 1994a, Rose et al. 1994, Sawhney u. Hall 1992, Schlüter et al. 1993].

1.4.3 Flk-1

Flk-1 (fetal liver kinase) ist eine in das Wachstum von Endothelzellen eingebundene Rezeptor-Tyrosinkinase [De Vries et al. 1992, Oelrichs et al. 1993].

Sie wird bei physiologischen Prozessen der Endothelzellproliferation exprimiert und leitet als Rezeptor Signalprozesse in der Vaskularisation ein [Millauer et al.

1993]. Es besteht eine spezifische Assoziation zwischen der Flk-1-Rezeptor Tyrosinkinase und Endothelzellen in allen Stadien der Embryonalentwicklung der Maus [Millauer et al. 1993]. Während Flk-1 Transkripte in proliferierenden Endothelzellen des embryonalen und postnatalen Gehirns reichlich vorhanden sind, kommen sie in Gehirnen Erwachsener physiologischerweise nicht vor [Millauer et al. 1993].

Flk-1 ist ein hochaffiner VEGF Rezeptor [Galland et al. 1993, Yancopoulos et al. 2000] und nimmt zusammen mit VEGF eine zentrale Rolle in der Vaskulogenese bzw. Angiogenese ein.

1.4.4 VEGF

VEGF (vascular endothelium growth factor) (Synonym: VPF [vascular permeability factor]) zählt ebenfalls zu den Angiogenese assoziierten Antigenen. Es ist durch seine potente selektive mitogene Stimulation von Endothelzellen und die Erhöhung der Gefäßpermeabilität in die Zellzyklus-induzierte Angiogenesekontrolle eingebunden [Brown et al 1993, Conn et al. 1990, Connolly et al. 1989, Ferrara u. Henzel 1989, Keck et al. 1989, Leung et al. 1989].

Während der Embryogenese wird es von ventrikulärem Neuroektoderm synthetisiert und fördert das Einwachsen von Kapillaren in das Gehirn vom perineuralen Gefäßplexus aus [Millauer et al. 1993]. Im Gegensatz dazu ist eine dauerhafte Expression von VEGF in Epithelzellen und fenestriertem Epithel des Plexus Choroideus und der Nierenglomeruli nachweisbar. Dieses belegt die Funktionen von VEGF als multifunktionaler Regulator von Endothelzellwachstum [Connolly et al. 1989, Ferrara et al. 1991, Gospodarowicz et al. 1989, Vartanian u. Weidner 1994] und -differenzierung [Bobik u. Campbell 1993, Breier et al. 1992, Ferrara et al. 1991, Sarzani et al. 1989] und seine Rolle bei Reparaturmechanismen des Gefäßendothels [Peters et al. 1993].

Es ist dokumentiert, dass Hypoxie VEGF-Synthese induzieren und dadurch indirekt Angiogenese stimulieren kann [Plate et al. 1992, Plate 1999, Shweiki et al. 1992]. Des Weiteren ist VEGF-Produktion in menschlichen Gliomzellen nachgewiesen, wodurch das Wachstum von Tumorendothelzellen stimuliert wird [Berkmann et al. 1993, Sure et al. 1997, Wizigmann-Voos et al 1995].

An einem Tiermodell wurde schließlich belegt, dass Flk-1- und VEGF-Expression spezifisch in Tumorendothelzellen stattfinden [Jakeman et al. 1992, Millauer et al. 1993, Oelrichs et al. 1993, Terman et al. 1992], nicht aber in Endothelzellen eines normalen adulten Gehirns [Plate et al. 1993].

Malek et al. wiesen 2000 in einem Zellkulturmodell einen weiteren Mechanismus nach, der zu VEGF-Expression führen kann [Malek et al. 2000]. Sie züchteten Endothelzellen, in denen zunächst keine VEGF-Expression stattfand. Nach Induktion eines Scherstress über die kultivierten Endothelzellen war jedoch eine rasche Expression von VEGF m-RNA detektierbar, wodurch der Einfluss von verändertem Scherstress auf die VEGF-Expression nachgewiesen ist [Malek et al. 2000].

Die Wirkung von VEGF auf normales Hirn wurde in vitro und an einem Tiermodell erprobt [Rosenstein et al. 1998]. Es zeigten sich in diesen Versuchen z.T. erhebliche Neovaskularisationen bzw. eine deutliche Gefäßdilatation als sekundärer Hinweis auf einen erhöhten Blutfluss [Rosenstein et al. 1998].

1.4.5 HIF-1 α

Der sogenannte „hypoxia inducible factor“ (HIF) gehört zu den sekundär auf die Angiogenese einflussnehmenden Faktoren. Es handelt sich um einen heterodimeren Transkriptionsfaktor, dessen Untereinheit 1 α sich spezifisch an HIF bindet, das eine essentielle Rolle in der Sauerstoff-Hömoostase spielt. Die Expression von HIF-1 α findet bei sinkender intrazellulärer Sauerstoffkonzentration statt und dient der Aktivierung einer Vielzahl von Genen deren Genprodukte die intrazelluläre Sauerstoffverfügbarkeit positiv beeinflussen [Semenza 1998]. Zu diesen Proteinen zählt u.a. auch VEGF. Die

Stimulation der VEGF-Expression in Ischämieversuchen und die Einleitung von Neovaskularisation durch HIF-1 α wurden tierexperimentell nachgewiesen [Jin et al. 2000, Marti et al. 2000].

1.4.6 Endoglin

Endoglin (Synonym: CD 105) ist eine Komponente des Rezeptorkomplexes von TGF- β 1 und - β 3 und wird besonders in Gefäßendothelien exprimiert. Eine Mutation des Endoglin-Gens liegt der hereditären hämorrhagischen Teleangiektasie (HHT) (Morbus Rendu-Osler-Weber) zugrunde [Abdalla et al. 2000, Berg et al. 1997, Bourdeau et al. 2000, Cheifetz et al. 1992, Chen et al. 2001, Matsubara et al. 2000]. Endoglin gilt als proliferations-assoziiierter endothelialer Marker [Bredow et al. 2000], der für die extraembryonale Angiogenese nötig ist [Artur et al. 2000]. Es wird ihm eine aktive Rolle bei der Gefäßneubildung unter erhöhtem Scherstress und/oder erhöhtem Blutfluss zugeschrieben [Matsubara et al. 2000]. Darüber hinaus werden eine Bedeutung für die Flk-1-Synthese [Cho et al. 2001] sowie eine Interaktion mit Sexualhormonen [Evangelou et al. 2000] angenommen.

1.4.7 Tie-2

Tie-2 und ebenso Tie-1 sind von Endothelzellen exprimierte Tyrosinkinasen [Uranishi et al. 2001].

Tie-2 (Synonym: Tek), mitsamt seinen Liganden Angiopoietin-1 und -2, spielt eine kritische Rolle in der Gefäßentwicklung und beim Gefäßerhalt. Angiopoietin-1 scheint für endotheliale und mesenchymale Zellinteraktionen während der Angiogenese notwendig zu sein, während Angiopoietin-2 bei der Rekonstruktion und dem Remodeling existierender Gefäße aktiv zu sein scheint. Tie-2 ist an der Rekrutierung periendothelialer Supportstrukturen zur Bildung reifer stabiler Gefäße beteiligt. Eine verminderte Tie-2 Expression könnte laut Hashimoto et al. das Vorliegen minderwertiger endothelialer

Supportstrukturen in AVMen erklären [Hashimoto et al. 2000]. Embryonen mit fehlender Tie-2 Expression weisen abnorme Gefäßnetzwerke auf [Uranishi et al. 2001], was die obige These unterstützt.

Des Weiteren berichten Vikkula et al., dass eine einzige Nucleotidmutation im Tie-2 Gen zu fehlender Aktivierung und damit zu einer seltenen Krankheit familiärer venöser Malformationen in multiplen Organen führt [Vikkula et al. 1996].

1.4.8 CD 31

CD 31 ist ein Zell-zu-Zell Adhäsions Glykoprotein aus der Immunglobulin Superfamilie, das auf den Oberflächen von Thrombozyten, einigen weißen Blutzellen und Endothelzellen zu finden ist [Uranishi et al. 2001].

Uranishi et al. verwendeten CD 31 neben dem von Willebrand Faktor (vWF) als Endothelzellmarker. Obwohl beide Proteine als endotheliale Marker bekannt sind, waren die Endothelien vieler Kavernome CD 31 negativ, während sie eine deutliche vWF Expression zeigten [Uranishi et al. 2001]. Die selektive Down-Regulation der CD 31 Expression könnte also eine Rolle in der Pathogenese von Kavernomen spielen. Möglicherweise zeigt sie aber auch andere spezifische Unterschiede in der Ultrastruktur von Endothelien kavernöser Angiome an, über die bereits zuvor berichtet wurde, einschließlich Permeabilität, Spalten zwischen Endothelzellverbindungen und eine defekte subendotheliale Gefäßschicht [Uranishi et al. 2001].

2 Material und Methoden

2.1 Patientenstatistik und Präparateauswahl

Zwischen Mai 1997 und Oktober 2000 wurden in der neurochirurgischen Klinik Marburg 48 Patienten mit Kavernomen operiert. Sämtliche Operationspräparate dieser Patienten, die zur pathologischen Diagnostik eingesandt wurden, sind im Rahmen dieser Studie immunhistochemisch auf das Vorhandensein verschiedener Antigene im Gewebe untersucht worden. Auf die postoperative Formalinfixierung der Präparate erfolgte innerhalb von 48 Stunden ihre Einbettung in Paraffin. Von den Paraffinblöcken wurden ca. 3 µm dicke Schnitte angefertigt, die auf mit APES (Aminopropyltriethoxysilane [Sigma]) vorbehandelte, sogenannte silanisierte Objektträger aufgebracht wurden. Diese Vorbehandlung der Objektträger führt zu einer besseren Haftung der Schnitte, wenn diese wie bei der Immunhistochemie z.T. notwendig Temperaturen nahe des Siedepunktes ausgesetzt werden.

Darüber hinaus gingen 16 Patienten des Universitätsklinikums Zürich, die in den Jahren 1997 und 1998 operiert wurden, sowie 23 ausschließlich pädiatrische Patienten der Abteilung für pädiatrische Neurochirurgie Würzburg, deren Operation in den Jahren 1985 – 2000 stattgefunden hat, in die Studie ein. Die Operationspräparate wurden analog der für Marburg beschriebenen Prozedur für die immunhistochemische Untersuchung aufbereitet.

Der Umfang der vorliegenden Studie beläuft sich auf insgesamt 87 Patienten, die in die Untergruppen „pädiatrisch“ und „adult“ unterteilt sind. Patienten mit einem Operationsalter von 0 – 19 Jahren wurden der pädiatrischen Gruppe zugeordnet, Patienten mit einem höheren Operationsalter der adulten Gruppe.

2.1.1 Klinische Patientendaten

Die relevanten klinischen Daten zu den Patienten aus der eigenen Klinik wurden anhand von Arztbriefen und Operationsberichten aus den jeweiligen Patientenakten recherchiert und katalogisiert.

Für die auswärtigen Kliniken wurden Tabellen erstellt, in die die benötigten klinischen Daten in kurzer Form eingetragen werden sollten, um dort den Arbeitsaufwand für die Recherche der klinischen Daten möglichst gering zu halten. Vom Universitätsklinikum Zürich wurden die gewünschten Patientendaten zu den 16 in die Studie eingeschlossenen Patienten freundlicherweise in der oben beschriebenen Form zur Verfügung gestellt. Eine Erhebung der klinischen Daten zu den 23 pädiatrischen Kavernompatienten, die aus der Universitätsklinik Würzburg in die vorliegende Studie eingingen, war nicht möglich. Die zuständigen Stellen sind seit Dezember 2000 mehrfach bezüglich der benötigten Daten kontaktiert worden und haben deren Zusendung mehrfach zugesichert. Die Daten zu den erwähnten 23 pädiatrischen Kavernompatienten aus Würzburg stehen zur Auswertung dennoch nicht zur Verfügung.

2.2 Kontrollen

Als Kontrollen zu den Präparaten der adulten Patienten wurden 14 adulte humane Gehirnpräparate, die diversen unterschiedlichen Hirnregionen entstammen, aus routinemäßigen Sektionen der Neuropathologie Marburg genutzt. Die Auswahl erfolgte so, dass bei 7 der 14 Präparate eine prämortale Hirnblutung stattgefunden hat, um Bedingungen ähnlich denen der Kavernompräparate zu simulieren, bei denen ja meist ebenfalls vor der Operation eine Blutung stattgefunden hat. In einem Präparat ohne Blutung konnte der Zufallsbefund einer arteriovenösen Malformation erhoben werden.

Zu den Präparaten der pädiatrischen Kavernompatienten wurden 5 humane pädiatrische Gehirn-Präparate aus verschiedenen Hirnregionen als Kontrollen herangezogen. Da in Deutschland kaum pädiatrische Sektionen, und insbesondere kaum pädiatrische Hirnsektionen, durchgeführt werden, konnte die Neuropathologie in Marburg kein geeignetes Material für die Kontrollen zu den pädiatrischen Kavernompräparaten zur Verfügung stellen. Daher bestand die Notwendigkeit, die benötigten Kontrollen von einer auswärtigen Klinik zu rekrutieren. Die Abteilung für Neuropathologie des Universitätsklinikums in

Zürich stellte freundlicherweise Präparate aus fünf pädiatrischen Autopsien als Kontrollen für die vorliegende Studie zur Verfügung.

Als Positivkontrollen dienten den einzelnen untersuchten Antikörpern ein Glioblastoma multiforme und eine Adeno-Karzinommetastase für PCNA und MIB-1, eine humane Plazenta und ein Glioblastoma multiforme für VEGF, eine fetale Niere für Flk-1, ein Glioblastoma multiforme für HIF-1 α , eine humane Plazenta für Tie-2, eine arteriovenöse Malformation für Endoglin sowie ebenfalls eine arteriovenöse Malformation für CD31.

Sowohl die oben benannten Positiv- als auch Negativ- (Null-) Kontrollen, die dem immunhistochemischen Färbeprozess ohne Zugabe des Primärantikörpers unterzogen wurden, waren in allen Färbedurchgängen als interne Kontrolle grundsätzlich enthalten. Unspezifische durch Fehler im Färbeprotokoll entstandene Immunreaktionen konnten dadurch ausgeschlossen werden.

2.3 Immunhistochemie

2.3.1 Spezielle Protokolle

Bei der vorliegenden Arbeit handelt es sich, wie bereits in der Einleitung erwähnt, um die Untersuchung der Operationspräparate von Kavernompatienten mit der Methode der Immunhistochemie (IHC).

Es wurde durchgehend die Strept-Avidin-Biotin Methode (Strept-ABC-Methode) angewandt [DAKO® Strept-AB-Komplex/HRP-Duett (Maus/Kaninchen), DAKO, Glostrup, Denmark *oder* DAKO® Catalized Signal Amplification (CSA) System, Peroxidase (Maus), DAKO Corporation, Carpinteria, CA, USA]. Beide Kits dienen der Amplifikation der Reaktion des Antigens mit dem Primärantikörper, wobei das CSA System eine 50-fach höhere Sensitivität aufweist als das Duett-Kit und somit auch die Detektion sehr kleiner Mengen in Gewebe vorhandenen Antigens erlaubt. Die Strept ABC-Methode basiert darauf, dass zunächst ein gegen eine bestimmte Spezies gerichteter Primärantikörper (bei Verwendung des Duett-Kit Maus oder Kaninchen, beim CSA-System Maus) an das im

Gewebe vorhandene zu detektierende Antigen bindet. Im Folgeschritt wird ein mit Biotin konjugierter Sekundärantikörper zugegeben, der an den Maus- oder Kaninchenantikörper bindet. Als nächstes wird ein Komplex aus ebenfalls biotinylierter (Meerrettich-) Peroxidase mit Streptavidin aufgetragen. Das Eiweißglykosid Avidin besitzt die Fähigkeit vier Moleküle des Vitamins Biotin physikalisch zu binden. Die freie Bindungsstelle des Avidin Moleküls des Peroxidasekonjugierten Biotin-Avidin-Komplexes führen zur Bindung an das Biotin des Sekundärantikörpers. Das Enzym Peroxidase, und somit indirekt das im Präparat vorhandene Antigen, wird mit DAB-Lösung (3,3-Diaminobenzidintetrahydrochlorid in Tris/HCL-Puffer mit Wasserstoffperoxid) als Chromogen-Substrat sichtbar gemacht. Es entsteht somit eine deutlich verstärkte Farbreaktion, die das gesuchte Antigen im Gewebeschnitt nachweist. Gründliches Spülen der Präparate in Pufferlösung zwischen den einzelnen Arbeitsschritten verhindert eine unspezifische Anfärbung des Gewebes.

2.3.1.1 PCNA

Nach einer Etablierungsphase wurde der PCNA-Antikörper [clone PC10, isotype Ig2a kappa; DAKO, Glostrup, Dänemark] in einer Verdünnung von 1:100 in 1,5%-igem Rinderserum eingesetzt. Das genaue Protokoll sieht eine Entparaffinierung der Gewebeschnitte für 10 Minuten in Xylol vor, wonach die Präparate in einer absteigenden Alkoholreihe in ein wässriges Milieu überführt werden, für 5 Minuten in 100%, danach 2 mal für je 5 Minuten in 96% und als letztes 2 mal für je 5 Minuten in 70% Alkohol. Zur Demaskierung von durch die Formalinfixierung nicht mehr zugänglichen Antigenen wird als sogenanntes Target Retrieval die folgende Mikrowellenbehandlung durchgeführt, die die Zellmembran für den Antikörper durchgängig macht. Die Präparate werden in Citratpuffer (pH 6,0) bei 750 Watt bis zum Siedepunkt erhitzt und bei geringerer Mikrowellenleistung 5 Minuten lang bei einer Temperatur knapp unterhalb des Siedepunktes in der Mikrowelle belassen. Danach werden sie bei Raumtemperatur ca. 3 Minuten abgekühlt, und es wird 1/3 des verwendeten Citratpuffers ersetzt, um weitere Kühlung der Präparate zu erreichen. Es folgen zwei weitere Erhitzungszyklen in der Mikrowelle, bei denen die Schnitte wieder

je 5 Minuten einer Temperatur knapp unterhalb des Siedepunktes ausgesetzt sind, mit entsprechender Abkühlphase wie bereits beschrieben zwischen den Zyklen. Nach dem dritten Zyklus in der Mikrowelle werden die Schnitte in ca. 30 Minuten auf Raumtemperatur abgekühlt. Zur Blockierung im Gewebe vorhandener endogener Peroxidaseaktivität werden die Präparate im nächsten Schritt für 20 Minuten in ein Bad 0,75%-iger gekühlter Wasserstoffperoxid-Methanollösung gestellt. Danach wird 3 mal 5 Minuten mit PBS-Puffer (phosphatgepufferte Kochsalzlösung pH 7,4) gespült. Die folgende 20-minütige Inkubation der Schnitte mit 1:5 in PBS-Puffer verdünntem Rinderserum dient der Blockade unspezifischer Hintergrundanfärbung durch Adsorption des Primärantikörpers an geladene Gewebsproteine. Ohne anschließenden Spülvorgang aber nach gründlichem Abtropfen werden nun 100 µl Primärantikörper (1:100 in 1,5% Rinderserum/PBS) pro Gewebsschnitt gleichmäßig aufgebracht und für 45 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert. Lediglich die Nullkontrolle wird mit 1,5% Rinderserum/PBS ohne Primärantikörper inkubiert. Es folgt wiederum ein Spülvorgang von 3 mal 5 Minuten in PBS-Puffer. Der Sekundärantikörper, wie bereits erwähnt ein biotinylierter Ziege-Anti-Maus/Kaninchen Antikörper (1:100 in 1,5% Rinderserum/PBS, 100 µl pro Schnitt), wird 30 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert, woran sich ein erneuter Spülvorgang wie oben beschrieben anschließt. Als nächstes inkubiert man ebenfalls für 30 Minuten bei Raumtemperatur mit dem zweiten Teil des Duett-Kits, dem peroxidasekonjugierten Strept-Avidin-Biotin Komplex. Vor der Chromogen-Reaktion wird nochmals gründlich gespült. Als Chromogen wird die oben beschriebene DAB-Lösung mit einer Einwirkzeit von 10 Minuten unter der Abzughaube verwendet. Es folgt die Gegenfärbung mit Hämalaun, unter fließendem Leitungswasser lässt man den Umschlag vom basischen pH geschehen (Bläuen), um das Zellbild zur Differenzierung sichtbar zu machen. Zuletzt werden die Präparate wieder in der aufsteigenden Alkoholreihe entwässert und nach einem 10-minütigen Xylol-Bad mit Corbitbalsam eingedeckt.

2.3.1.2 MIB 1

Der MIB 1- Antikörper (Dianova, Hamburg, Deutschland, DIA 505) wird analog dem Protokoll für PCNA in einer Verdünnung von 1:100 verwendet.

2.3.1.3 Flk-1

Der Flk-1 Antikörper (Flk-1(A3) sc-6251, Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, CA, USA) wird ebenfalls analog dem Protokoll für PCNA verwendet. Die Verdünnung für diesen Antikörper beträgt 1:40.

2.3.1.4 VEGF

Der Antikörper gegen VEGF (Anti-VEGF (human), clone JH 121, Upstate Biotechnology, Waltham, MA, USA) wird 1:100 verdünnt. Die Inkubationszeit für diesen Antikörper beträgt 60 Minuten. Die Inkubationszeiten des Sekundärantikörpers und des Strept-Avidin-Biotin-Enzymkomplexes betragen jeweils 40 Minuten. Ansonsten findet auch hier das für PCNA ausführlich beschriebene Protokoll Anwendung.

2.3.1.5 Hif-1 α

Der Antikörper gegen Hif-1 α (Monoclonal IgG 2b(clone H1 α 67) Cat.# NB 100-123, Novus Biologicals, Littleton, USA) wird in einer Konzentration von 1:1000 verwendet. Die Mikrowellenbehandlung erfolgt wie im PCNA-Protokoll beschrieben. Anschließend werden die Präparate 3 mal 5 Minuten in TBS Trishydroxymethylaminomethan-Base-Salzsäure-Puffer, 0,05 M, pH 7,6) gespült. Es folgt die Anwendung des Dako-Biotin Blocking Systems (DAKO Corporation, Carpinteria, CA, USA). Der weitere Färbeporgang wird mit dem CSA-System der Firma Dako (DAKO Corporation, Carpinteria, Ca, USA) durchgeführt.

2.3.1.6 Endoglin

Der Antikörper gegen Endoglin (CD105, Lot-Nr. 0026F, DAKO Corporation, Carpinteria, CA, USA) wird in einer Konzentration von 1:2000 verwendet. Es wird kein Target Retrieval, weder in der Mikrowelle noch durch enzymatische Andauung, durchgeführt. Als Waschpuffer findet der im Hif-1 α Protokoll beschriebene TBS-Puffer Anwendung. Die Behandlung der Schnitte erfolgt ebenfalls mit dem Dako Biotin Blocking System (DAKO Corporation, Carpinteria, CA, USA) und dem CSA-System der Firma Dako.

2.3.1.7 Tie-2

Der Antikörper gegen Tie-2 (Ani-humanTie-2 Antibody, Cat. # AF313, Lot # CMF02, R&D Systems, Deutschland) wird in einer Verdünnung von 2 μ g/ml verwendet. Da es sich um einen in der Ziege hergestellten Antikörper handelt, wird der gegen Maus und Kaninchen gerichtete biotinylierte Sekundärantikörper des Dako Duett-Kits durch einen ebenfalls biotinylierten Anti-Ziege Sekundärantikörper ersetzt (Biotinylated Rabbit Anti-Goat Immunoglobulins, Code No. E 0466, Lot 109, DAKO, Glostrup, Dänemark), der in einer Verdünnung von 1:400 eingesetzt wird. Wie bei Hif-1 α und Endoglin wird Tbs-Puffer als Waschpuffer verwendet. Vor dem Auftragen des Primärantikörpers erfolgt als zusätzlicher Arbeitsschritt die Anwendung des Dako Biotin Blocking Systems (Code No.: X0590, DAKO Corporation, Carpinteria, CA, USA). Ansonsten wird die Färbung in allen Schritten genau analog zum Protokoll von PCNA mit dem Dako Duett-Kit durchgeführt.

2.3.1.8 CD 31

Der Antikörper gegen CD 31 (Monoclonal Maus Anti Human CD 31, PECAM-1, Endothelzellen, Klon JC 70 A, Isotyp IgG1 Kappa, DAKO Corporation, Carpinteria, CA, USA) wird in einer Verdünnung von 1:100 verwendet. Das

Target Retrieval zur Demaskierung von Antigen, das durch die Formalinfixierung unzugänglich geworden ist, erfolgt mittels enzymatischer Andauung durch Trypsin (Trypsin, Code No. 2012, Lot 108, DAKO) für eine Inkubationszeit von 60 Minuten bei Raumtemperatur. Eine zusätzliche Mikrowellenbehandlung findet nicht statt. Das weitere Vorgehen erfolgt analog dem für PCNA beschriebenen Protokoll.

2.4 Auswertung

Die nach dem Färbevorgang mit Deckgläschen versehenen Präparate wurden von erfahrenen Untersuchern befundet. Uneindeutige Präparate wurden mehrfach befundet und schließlich vom Projektleiter als definitiv positiv oder negativ beurteilt. Aufgrund von Artefakten nicht zu beurteilende Präparate wurden verworfen und nachgefärbt.

2.4.1 Quantifizierung

Für alle untersuchten Antigene wurde in der vorliegenden Studie lediglich das Vorhandensein einer positiven oder negativen Immunreaktion dokumentiert.

Aufgrund der ausgesprochen schwierigen Bestimmung des Verhältnisses der positiv angefärbten Zellen zur Gesamtzellzahl der Endothel- bzw. Gefäßwandzellen eines Kavernoms auf einem Gewebeschnitt wurde von einer Quantifizierung der positiven Immunreaktionen abgesehen. Wegen der zu erwartenden Ungenauigkeiten wurde daher eine entsprechende Auszählung für diese Studie als nicht sinnvoll erachtet.

Ebenfalls wurde die Stärke einer positiven Immunreaktion nicht näher quantifiziert, weil die Färbeintensität der von verschiedenen Personen in zeitlichen Abständen durchgeführten Färbeserien des gleichen Antikörpers z.T. Unterschiede aufwies.

2.4.2 Spezielle Antikörper

Bei der Bewertung der Immunreaktion für die Antikörper gegen PCNA und Mib-1 wurde auf das Vorliegen einer nukleären Färbung im Bereich des Endothels geachtet. Insbesondere positiv färbende hämatopoetische Zellen gingen nicht in diese Bewertung mit ein.

Für die Antikörper gegen Flk-1, VEGF, HIF-1 α , Endoglin, Tie-2 und CD 31 wurden positive Anfärbungen im Bereich des Endothels, Subendothels und des perivaskulären Gewebes getrennt diagnostiziert.

2.4.3 Schnittsystematik

Entsprechend ihrer neuropathologischen Eingangsnummern sowie ihrer Herkunft aus unterschiedlichen Kliniken wurden die untersuchten Gewebsschnitte in Sammelschubladen systematisch archiviert. Fehlerhafte Färbeserien und Schnitte, deren Beurteilung aufgrund von Artefakten o.ä. nicht möglich war, wurden verworfen.

2.4.4. Fotodokumentation

Die Fotodokumentation besonders geeigneter Präparate wurde in der Neuropathologie Marburg durchgeführt. Die Digitalisierung der entstandenen Dias erfolgte in der neurochirurgischen Klinik, wo sie schließlich elektronisch gespeichert und in die vorliegende Arbeit eingefügt wurden.

2.5 Statistische Methoden

Die statistische Auswertung wurde bezüglich der Unterschiede zwischen verschiedenen Patientengruppen in der Expression der untersuchten Antigene vorgenommen.

Die Differenz der relativen Häufigkeiten zwischen zwei voneinander unabhängigen Gruppen wurde aus Vierfeldertafeln berechnet. Dazu wurde das exakte Konfidenzintervall mit einer Konfidenzwahrscheinlichkeit von 95% sowie ein p-Wert mittels Exakter Test mit dem Programm StatXact (Cytel Software, Cambridge MA, USA) errechnet. Sofern 0 außerhalb des Konfidenzintervalls liegt, kann die Nullhypothese, die besagt, dass es keinen relevanten Unterschied zwischen den verglichenen Gruppen gibt, verworfen werden. In diesem Fall geht man von einem signifikanten Unterschied der relativen Häufigkeiten zwischen den beiden untersuchten Gruppen aus, dessen Höhe im Bereich des Konfidenzintervalls liegt. Für ein 95%-Konfidenzintervall, in dem 0 nicht enthalten ist, ist der p-Wert $< 0,05$; d.h. die Wahrscheinlichkeit das beobachtete Studienergebnis oder ein noch extremeres unter Richtigkeit der Nullhypothese zu beobachten läge bei weniger als 5%.

Die statistische Auswertung erfolgte mit der Beratung und Unterstützung des Institutes für Medizinische Biometrie und Epidemiologie der Philipps-Universität Marburg.

3 Ergebnisse

3.1 Klinischer Teil

3.1.1 Epidemiologie / Patientenstatistik

Die vorliegende Studie hat einen Gesamtumfang von 87 Kavernompatienten, deren Operationspräparate aus den verschiedenen vorgenannten Kliniken rekrutiert wurden, und an denen vorbeschriebene immunhistochemische Untersuchungen durchgeführt wurden. Die Patienten sind in die Untergruppen „pädiatrisch“ und „adult“ unterteilt, wobei Patienten mit einem Operationsalter von 0 – 19 Jahren der pädiatrischen Gruppe zugeordnet werden, Patienten mit einem höheren Operationsalter der adulten Gruppe.

Die Anzahl der pädiatrischen Patienten beträgt 31, mit einem annähernd ausgeglichenen Geschlechterverhältnis von 15 weiblichen zu 16 männlichen Patienten. Die Anzahl der adulten Patienten beträgt 56, wovon 31 (55,4%) weiblichen und 25 (44,6%) männlichen Geschlechts sind. In der Gruppe aller weiblichen Patienten befinden sich 19 Patientinnen (41,3%) in einer Altersspanne von 14 – 40 Jahren, in der die ausgeprägte Sekretion weiblicher Geschlechtshormone anzunehmen ist.

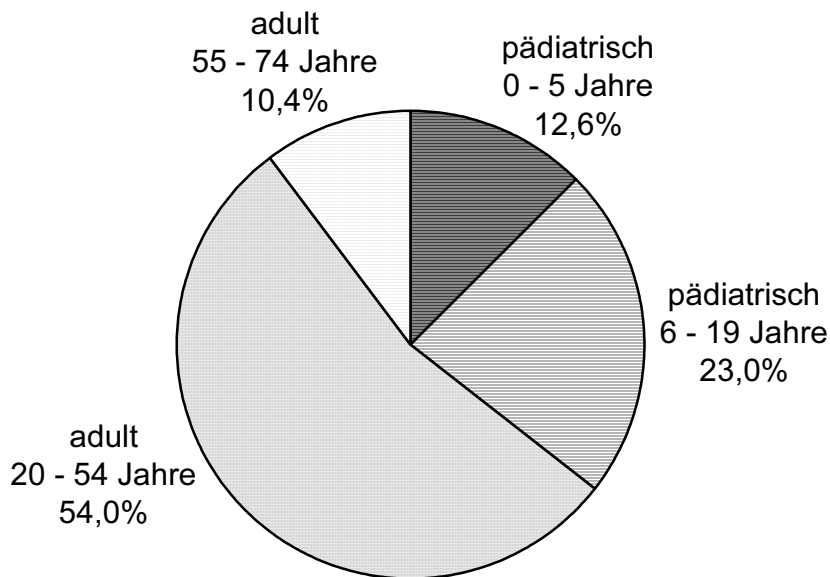
Das Durchschnittsalter aller Patienten beträgt 30,3 Jahre. Innerhalb der pädiatrischen Untergruppe beträgt das durchschnittliche Alter 9,3 Jahre, von 0 Jahren bis zu 19 Jahren, in dem adulten Patientengut beträgt das Durchschnittsalter 41,9 Jahre, von 23 bis zu 74 Jahren. Von den 31 pädiatrischen Patienten waren zum Operationszeitpunkt 11 Kinder (35,48%) erst 5 Jahre alt oder jünger. Innerhalb der adulten Patientengruppe waren neun Patienten älter als 55 Jahre (16,07%).

Von 11 Patienten stand mehr als ein Operationspräparat für die immunhistochemischen Färbungen zur Verfügung. Von zwei adulten und sieben pädiatrischen Patienten gibt es jeweils zwei unterschiedliche Paraffinblöcke, von zwei pädiatrischen Patienten sind jeweils drei verschiedene Präparate in die vorliegende Studie eingeschlossen. Dadurch ergibt sich eine

Gesamtanzahl von 100 untersuchten Präparaten bei der o.g. Zahl von 87 Studienpatienten. Die oben beschriebene Altersverteilung ist in Graphik 1 dargestellt.

Graphik 1 (Altersverteilung)

n=87



3.1.2 Lokalisation

Die Erhebung der genauen Lokalisation der untersuchten Läsionen sowie der Symptomatik der Patienten bezieht sich ausschliesslich auf das adulte Patientenkollektiv. Die klinischen Daten des größten Anteils an pädiatrischen Patienten (23/31) aus der Universitätsklinik Würzburg stehen nicht zur Auswertung zur Verfügung. Wegen der zu geringen Fallzahl an pädiatrischen Patienten, deren klinische Daten verfügbar sind, können für diese Patientengruppe keine repräsentativen und/oder signifikanten Aussagen getroffen werden. Daher muss auf die Analyse von Lokalisation und Symptomatik des pädiatrischen Patientengutes verzichtet werden.

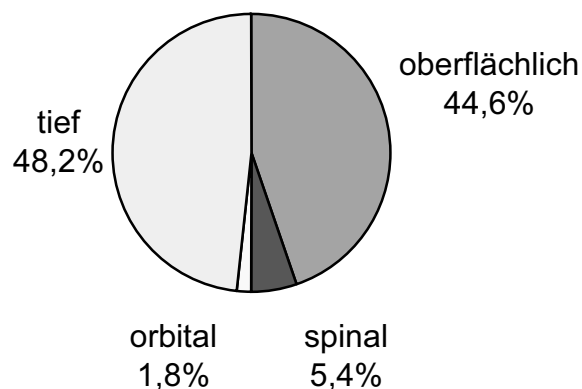
An tiefen Läsionen wurden 27 (48,2%) von 56 adulten Patienten operiert, 25 Patienten (44,6%) an oberflächlichen, drei Patienten (5,4%) an spinalen Läsionen und ein Patient (1,8%) an einem in der Orbita lokalisierten Kavernom. Von den tiefen Läsionen sind 14 (51,9%) im Hirnstamm gelegen, davon acht im Mittelhirn (29,6%), vier im Bereich der Pons (14,8%) und zwei in der Medulla Oblongata (7,4%). Bei den anderen tiefliegenden Kavernomen handelt es sich um vier Läsionen in den Basalganglien (14,8%), drei thalamische (11,1%), drei insuläre (11,1%) und drei cerebelläre (11,1%) Läsionen.

Die jeweilige genaue Kavernomlokalisierung der einzelnen Patienten ist aus Tabelle 1 ersichtlich, die sämtliche klinischen Daten aller 56 adulten Patienten zusammenfasst.

Die Graphiken 2 und 3 illustrieren die Lokalisationsverteilung aller in die Studie eingeschlossenen Kavernome respektive die Lokalisationsverteilung, speziell der tiefen Läsionen.

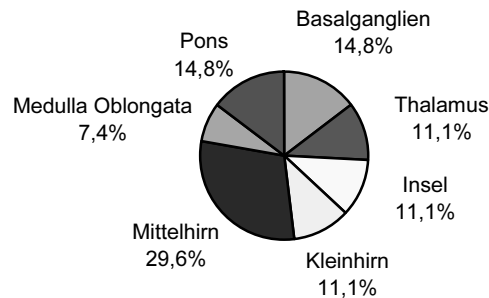
Graphik 2 (Lokalisation aller adulten Kavernome)

n=56



Graphik 3 (Lokalisation der tiefen adulten Kavernome)

n=27



3.1.3 Blutungen / LCMOH

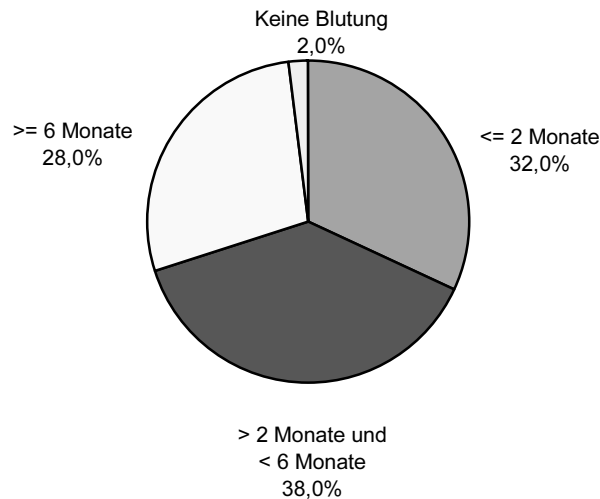
Das Intervall zwischen der letzten klinisch stattgehabten Blutung (= Last Clinical Manifestation Of Hemorrhage = LCMOH) und der Operation ist bei sechs (10,7%) der 56 adulten Patienten nicht bekannt. Der Patient mit dem Orbitakavernom hat vor seiner Operation keine klinisch manifeste Blutung erlitten. Bei den verbleibenden 49 adulten Patienten erstreckt sich das Intervall zwischen der letzten klinisch stattgehabten Blutung und der Operation auf einen Zeitraum zwischen 1 Tag und 3 Jahren.

Von den 50 Patienten, deren Blutungsanamnese bekannt ist, hat einer (2%), wie bereits erwähnt, praeoperativ nicht geblutet, bei 16 Patienten (32%) liegt die letzte Blutung 2 Monate oder weniger zurück, 19 Patienten (38%) wurden in einem Intervall nach der letzten Blutungsmanifestation operiert, das grösser als 2 Monate und kleiner als 6 Monate ist, und bei 14 Patienten (28%) lag ein Zeitraum von mehr als 6 Monaten zwischen Blutung und Operation.

Die Verteilung der verschiedenen Intervalle zwischen Blutungsmanifestation und Operationszeitpunkt geht aus Graphik 4 hervor.

Graphik 4 (Last Clinical Manifestation of Hemorrhage (LCMOH), adulte Patienten)

n=50



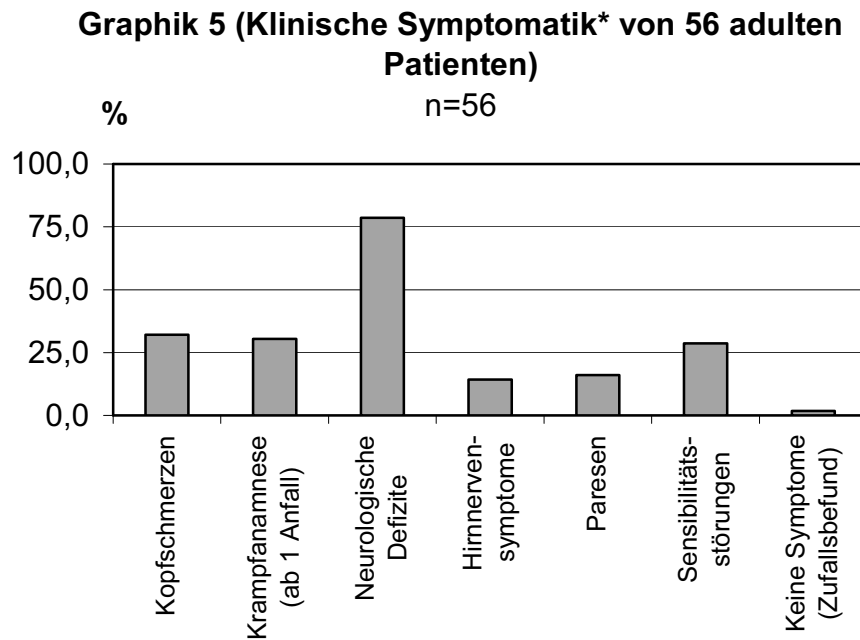
3.1.4 Symptomatik

Die klinische Symptomatik aller 56 adulten Patienten der vorliegenden Studie ist bekannt. Nur ein Patient (1,8%), bei dem ein superfizielles frontal lokalisiertes Kavernom einen Zufallsbefund darstellt, wies praeoperativ keinerlei Symptome auf. Acht Patienten (14,3%) waren monosymptomatisch und fielen lediglich durch einen oder mehrere Krampfanfälle als einziges Symptom auf, die anderen 47 Patienten (83,9%) wiesen jeweils multiple Symptome auf.

Die jeweilige Symptomatik der einzelnen Patienten ist Tabelle 1, die alle klinischen Daten zusammenfasst, zu entnehmen.

Insgesamt betrachtet, unter Berücksichtigung der häufig vorliegenden Multisymptomatiken, litten 18 der untersuchten Patienten (32,1%) praeoperativ an Kopfschmerzen. Eine positive Krampfanamnese mit mindestens einem Anfall ist bei 17 Patienten (30,4%) eruierbar, bei acht von ihnen, wie bereits erwähnt, als einziges klinisches Symptom. Neurologische Defizite traten bei 44 Patienten (78,6%) auf. Hirnnervenausfälle bzw. -störungen wiesen acht (14,3%) der 56 adulten Patienten auf. Neun Patienten (16,1%) litten unter Paresen und 16 (28,6%) unter Sensibilitätsstörungen.

Graphik 5 veranschaulicht die Häufigkeiten der verschiedenen klinischen Symptome.



* Mehrfachsymptomatik möglich

Tabelle 1 (klinische Daten, 56 adulte Patienten)

Nr.	Präparat-Nr.	OP-Alter (Jahre)	Geschlecht (M/W)	Symptomatik	Symptomatik (Schlüssel)	LCMOH	Lokal	Lokal (Schlüssel)
1	ZN 98 540	38	M	sensibles Hemisyndrom, Sehstörung	C 3, C 4	2 Monate	Pons	B 6 b
2	NE 891/98	34	W	Parästhesie, Neurolog. Defizit	C 3	4 Wochen	Re. Medulla oblongata	B 6 c
3	ZN 98 452	50	M	Hydrocephalus, Kopfschmerz, Ataxie, Anosmie, Schwindel	A, C 4	k.A.	Kleinhirnoberwurm	B 7
4	NE 691/96	42	W	Krampfananamnese	B	12 Monate	Re. Temporal	A 2
5	NE 215/00	29	M	Schwindel, Sprachstörung, Neurolog. Defizit	C 4	7 Monate	Re. Fronto-dorsal	A 1
6	NE 977/99	39	M	Kopfschmerz, Neurolog. Defizit, Parästhesie	A, C 3, C 4	4 Monate	Pons	B 6 b
7	NE 442/97	37	M	Schwindel, Neurolog. Defizit, Parästhesie, Hörstörung	C 1, C 3, C 4	4 Monate	Pons	B 6 b
8	ZN 97 578	52	M	Krampfananamnese	B	3 Monate	Gyros temporalis superior	A 2
9	NE 652/99	23	W	Kopfschmerz, Krampfananamnese	A, B	3 Monate	Re. Präzentral	A 1
10	NE 54/99	39	W	Hörstörung, Sprachstörung, Neurolog. Defizit	C 1, C 4	15 Monate	Pons	B 6 b
11	NE 578/97	45	W	Kopfschmerz, Schwindel, Sehstörung	A, C 4	6 Monate	Li. Temporal	A 2
12	NE 598/00	46	W	Gangstörung, Paraspastik re. betont, Hydrocephalus (Shunt)	C 2	5 Monate	Li. Mesencephalon (Viehügelplatte)	B 6 a
13	ZN 97 988	24	W	Krampfananamnese	B	k.A.	Gyros subcentralis	A 2
14	ZN 98 138	57	M	Kopfschmerz, Sehstörung	A, C 4	2 Monate	Li. Temporo-occipital	A 4
15	NE 528/99	25	M	Hörstörung, Schwindel	C 4	6 Monate	Li. Caudatum	B 5 a
16	NE 348/98	50	W	Neurolog. Defizit, Kopfschmerz, Sehstörung, Parästhesie	A, C 3, C 4	7 Monate	Spinal Re. C3	C
17a	NE 249/00	46	W	Parästhesie, Neurolog. Defizit	C 3, C 4	3 Monate	Spinal Li. C6 / C7	C
17b	NE 250/00							
18	NE 1187/99	48	W	Parästhesie, Neurolog. Defizit	C 3, C 4	6 Monate	Re. Pons	B 6 b
19	NE 336/97	29	M	Krampfananamnese	B	3 Monate	Li. Zentral	A 3
20	NE 1201/99	74	W	Schwindel, Sprachstörung	C 4	1 Tag	Re. Kleinhirn	B 7
21	NE 689/98	51	M	Kopfschmerz, Schwindel, Sehstörung, Neurolog. Defizit	C 2, C 3, C 4	1 Woche	Re. Brückenarm	B 6 b
22	ZN 97 1077	57	M	Kopfschmerz, Schwindel, Sehstörung	C 2, C 3, C 4	1 Monat	Septum pellucidum	B 5 b
23	NE 571/98	31	W	Neurolog. Defizit, Schwindel, Sehstörung, Sprachstörung	C 2, C 3, C 4	1 Jahr	Pons	B 6 b
24	NE 225/00	41	W	Krampfananamnese, Parästhesie	B, C 3	4 Monate	Li. Occipito-medial	A 4
25	NE 805/99	34	W	Krampfananamnese, Sprachstörung, Neurolog. Defizit	B, C 4	4 Monate	Li. Angulus	A 3
26	NE 127/00	40	M	Krampfananamnese, Neurolog. Defizit	B, C 4	2 Monate	Li. Temporo-basal	A 2
27	ZN 97 770	59	W	Krampfananamnese, Kopfschmerz, Handparese re., Aphasie	A, B, C 2, C 4	7 Monate	Gyros temporalis superior	A 2
28	NE 895/98	29	M	Krampfananamnese, Kopfschmerz	A, B	4 Monate	Li. Frontal	A 1
29	NE 1140/98	23	M	Parästhesie	C 3	4 Monate	Pontomesencephalon	B 6 a
30	NE 638/97	67	M	keine (Zufallsbefund)	D	6 Monate	Re. Präzentral	A 1
31	NE 557/97	30	M	Kopfschmerz, Schwindel, Sehstörung, Neurolog. Defizit	A, C 4	3 Wochen	Mesencephalon	B 6 a
32	ZN 97 1237	31	W	Krampfananamnese	B	k.A.	Temporo-occipital	A 2
33	NE 436/99	58	W	Krampfananamnese, Parästhesie	B, C 3	6 Monate	Insel	B 5 c
34	NE 79/98	27	W	Sehstörung, Neurolog. Defizit	C 1, C 4	2 Monate	Re. Pinealis	B 6 a
35	NE 220/99	52	W	Schwindel, Neurolog. Defizit, Parästhesie	C 1, C 3, C 4	1 Monat	Re. Pons	B 6 b
36	NE 439/98	46	M	Sehstörung, Neurolog. Defizit, Sprachstörung, Kopfschmerz	A, C 1, C 4	3 Jahre	Mesencephalon / Thalamus	B 5 b
37	NE 179/97	32	W	Krampfananamnese	B	3 Monate	Li. Temporo-lateral	A 2
38	NE 1160/98	48	W	Neurolog. Defizit, Sehstörung, Schwindel	C 1, C 2, C 4	4 Tage	Medulla oblongata	B 6 c
39	ZN 97 390	46	W	Beinparese re., einschließende Beinschm	C 1, C 2	15 Jahre	Spinal C2 intramedial	C
40	ZN 98 159	57	M	Krampfananamnese, Kopfschmerz, Hörstörung	A, B, C 4	k.A.	Parieto-occipital	A 3
41	NE 1073/99	40	M	Neurolog. Defizit, Kopfschmerz, Schwindel, Sehstörung	A, C 4	3 Monate	Re. Kleinhirn	B 7
42	ZN 97 496	29	W	Sehstörung	C 4	2 Wochen	Lobulus parietalis + inferius, Praecuneus	A 3
43	NE 472/98	24	W	Krampfananamnese	B	3 Monate	Li. Präzentral	A 1
44	NE 1110/98	38	W	Sonstige, Schwindel	C 4	4 Wochen	Re. Temporo-mesencephal	A 2
45	ZN 98 1517	34	M	Krampfananamnese, Kopfschmerz	A, B	k.A.	Li. Fronto-basal	A 1
46	NE 243/00	32	W	Neurolog. Defizit	C 2	5 Monate	Li. Insula	B 5 c
47	ZN 98 111	68	M	Kopfschmerz, Spontanmyasthenus nach re., Schwindel	A, C 1, C 4	k.A.	Li. Nucleus caudatus	B 5 a
48	NE 1119/98	60	W	Sehstörung, Kopfschmerz	A, C 4	5 Wochen	Re. Occipital	A 4
49	NE 807/97	41	W	Neurolog. Defizit, Sprachstörung	C 2, C 4	2 Jahre	Li. Stammganglien	B 5 a
50	NE 510/97	41	M	Parästhesie	C 3	4 Monate	Re. Insel / Stammganglien	B 5 c
51	NE 357/99	54	M	Schwindel, Kopfschmerz	A, C 4	4 Monate	Re. Caudatum	B 5 a
52	NE 112/00	37	M	Krampfananamnese, Neurolog. Defizit	B	2 Monate	Li. Temporal	A 2
53	NE 63/00	30	W	Kopfschmerz, Parästhesie	A, C 3	2 Monate	Li. Occipito-medial	A 2
54	ZN 97 858 (I)	52	M	Sehstörung, Exophthalmus re.	C 4	keine	Re. Orbita	D
55	NE 1081/99	41	W	Sehstörung, Sprachstörung	C 4	3 Monate	Li. Frontal	A 1
56a	NE 110/99	41	W	Kopfschmerz, Neurolog. Defizit	A, C 4	3 Monate	3. Ventrikel	B 5 b
56b	NE 112/99							

Schlüssel Lokalisationen

A	Oberflächlich		
	1	frontal	
	2	temporal	
	3	parietal	
	4	occipital	
B	Tief		
	5	Basalganglien	a
		Thalamus	b
		Insel	c
	6	Mittelhirn	a
		Pons	b
		Medulla oblongata	c
	7	Kleinhirn	
C	Spinal		
D	Sonstige (z.B. Orbita)		

Schlüssel Symptomatik (Mehrfachsymptomatik möglich):

A	Kopfschmerzen
B	Krampfananamnese (ab 1 Anfall)
C	Neurologische Defizite
	1 Hirnnerven
	2 Paresen
	3 Sensibilität
	4 Sonstige
D	Keine

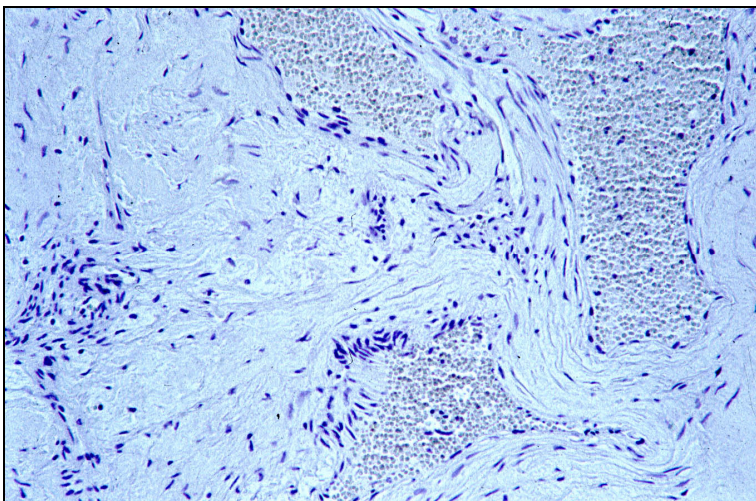
Abkürzungen Tabelle 1:

LCMOH:	Last Clinical Manifestation Of Hemorrhage
k.A.:	Keine Angabe

3.2 Immunhistochemie

Die immunhistochemischen Ergebnisse der Kontrollen und der Studienpräparate der pädiatrischen und der adulten Patientensubgruppen werden im Folgenden dargestellt. Daran anschließend werden die Korrelationen, die sich aus der Auswertung der immunhistochemischen Untersuchungen ergeben, vorgestellt. Photographien von jeweils einem beispielhaft ausgewählten Präparat mit positiver Immunreaktion pro untersuchtem Antikörper dienen der Illustration der immunhistochemischen Ergebnisse. Als Beispiel für eine negative Immunreaktion zeigt Abbildung 1, exemplarisch für diverse negative Immunreaktionen, ein endoglin-negatives Präparat.

Abbildung 1 (Negative Immunreaktion auf Endoglin)



Kavernom ZN 97 858 (I) eines adulten Patienten in 20-facher Vergrößerung. Negative Immunreaktion in Endothel, Subendothel und perivaskulärem Gewebe.

3.2.1 Pädiatrische Kontrollen

Als Kontrollen zu den Präparaten der pädiatrischen Patienten der Studie dienten 5 Präparate aus pädiatrischen Sektionen der Universitätsklinik Zürich. Bei diesen Patienten lag das Alter zum Todeszeitpunkt zwischen 2 und 11 Jahren. Die Präparate entstammen verschiedenen Hirnregionen, und es lagen unterschiedliche Todesursachen, jedoch keine letalen kavernombedingten Hirnblutungen, vor.

Die immunhistochemischen Untersuchungen ergaben keine Immunreaktion für die untersuchten Antigene im Endothel, im Subendothel und im perivaskulären Gewebe. Einzige Ausnahmen waren eine endotheliale Anfärbbarkeit für Anti-Endoglin in allen 5 pädiatrischen Kontrollen sowie in einem Präparat eine ausschließlich endotheliale positive Immunreaktion für PCNA und CD 31.

Die Gesamtdaten zu den pädiatrischen Kontrollpräparaten sind in Tabelle 2 dargestellt.

Tabelle 2 (Pädiatrische Kontrollpräparate aus Sektionen)

Nr.	Präparat-Nr.	Geb.Dat.	Todesdat.	PCNA	Mib-1	flk-1			VEGF			HIF 1 a			Tie-2			Endoglin			CD 31		
						E	S	P	E	S	P	E	S	P	E	S	P	E	S	P	E	S	P
1	ZA 97.692	29.05.1995	19.10.1997	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	1	0	0
2	ZA 98.197	22.12.1988	23.02.1998	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0
3	ZA 99.188	05.06.1996	03.04.1999	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0
4	ZA 99.276	27.07.1988	24.05.1999	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0
5	ZA 2000.37	30.09.1998	16.01.2000	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0

Abkürzungen Tabelle 2:

E Endothel
 S Subendothel
 P Perivaskuläres Gewebe
 0 negative Immunreaktion
 1 positive Immunreaktion

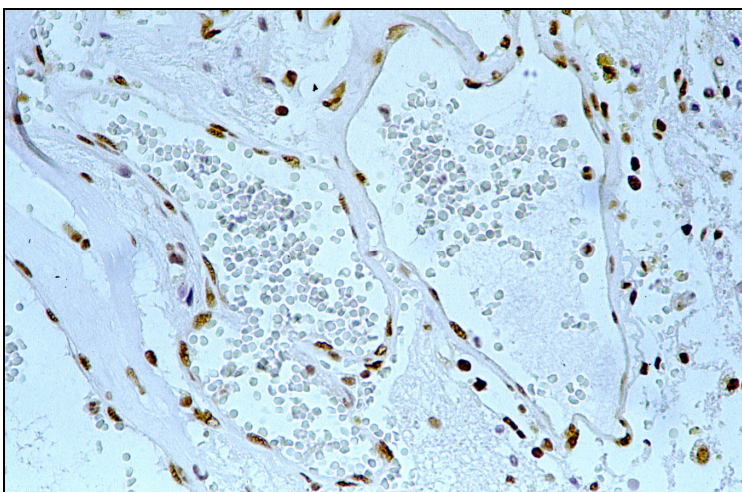
3.2.2 Pädiatrische Kavernome

Bei den Antikörpern Flk-1, VEGF, Hif-1 α , Tie 2 Endoglin und CD 31 wurden das Endothel, das Subendothel und das perivaskuläre Gewebe getrennt auf positive Immunreaktionen hin untersucht, wohingegen bei den Antikörpern gegen PCNA und Mib-1, die beide Endothelzellproliferation detektieren, nur das Endothel untersucht wurde.

Die Ergebnisse der immunhistochemischen Färbungen der Präparate der 31 pädiatrischen Patienten der Studie sind in Tabelle 3 einzeln aufgeschlüsselt und in Tabelle 6 in absoluten Zahlen und in prozentualen Angaben zusammengefasst. In Graphik 6 sind sie in Form eines Balkendiagramms visualisiert und den prozentualen Ergebnissen der Gesamtheit der Patienten der vorliegenden Studie sowie ausschliesslich des adulten Patientengutes gegenübergestellt.

Im Einzelnen fand sich bei den 42 pädiatrischen Operationspräparaten eine positive nukleäre Immunreaktion für PCNA im Endothel der Läsionen in 39 Fällen (92,9%) und für MIB-1 in 22 Fällen (52,4%). Abbildung 2 zeigt eine positive nukleäre Immunreaktion für MIB-1 in einem Präparat eines pädiatrischen Patienten.

Abbildung 2 (Positive Immunreaktion auf MIB-1)

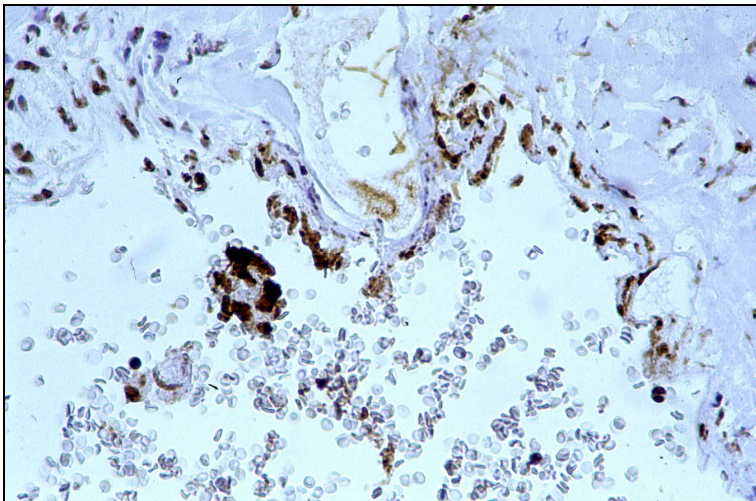


Kavernom NE 1202/99 eines pädiatrischen Patienten in 40-facher Vergrößerung.

Die positive nukleäre Immunreaktion im Endothel weist die Expression von MIB-1 nach.

Eine positive Immunreaktion für Flk-1 wurde im Endothel in 29 Schnitten (69%), im Subendothel in 19 Schnitten (45,2%) und im perivaskulären Gewebe in 4 Schnitten (9,5%) detektiert. Für VEGF ergab sich eine endotheliale Positivität in 5 Fällen (11,9%), eine subendotheliale Positivität in 2 Fällen (4,8%) und eine perivaskuläre in einem Fall (2,4%). Eine Anfärbbarkeit durch den Hif-1 α -Antikörper konnte in 26 Präparaten (61,9%) endothelial, in 23 Präparaten (54,8%) subendothelial und in 27 Präparaten (64,3%) perivaskulär nachgewiesen werden. Die Expression von Hif-1 α in allen drei untersuchten Gewebeschichten wird in Abbildung 3 illustriert.

Abbildung 3 (Positive Immunreaktion auf Hif-1 α)



Kavernom NE 1202/99 eines pädiatrischen Patienten in 20-facher Vergrößerung.

Die positive Immunreaktion in Endothel, Subendothel und perivaskulärem Gewebe weist die Expression von Hif-1 α in diesen Gewebeschichten nach.

Für Tie-2 wiesen 3 Fälle (7,1%) eine positive endotheliale Expression auf. Subendothelial und perivaskulär konnte Tie-2 in keinem Fall detektiert werden. Eine positive Immunreaktion auf Endoglin konnte in allen drei untersuchten Gewebeschichten in 34 Schnitten (81%) nachgewiesen werden. Bei endothelialer Positivität für Endoglin waren in allen Fällen gleichzeitig eine subendotheliale und perivaskuläre Positivität nachweisbar. Der CD 31-Antikörper rief in 10 Präparaten (23,8%) eine endotheliale Immunreaktion hervor, im Subendothel und im perivaskulären Gewebe zeigte sich in jeweils zwei Präparaten (4,8%) eine positive Immunreaktion.

Tabelle 3 (Pädiatrische IHC Ergebnisse)

Nr.	Präparat-Nr.	PCNA	MIB-1	Flik-1			VEGF			HIF 1 a			Tie 2			Endoglin			CD 31		
		E	E	E	S	P	E	S	P	E	S	P	E	S	P	E	S	P	E	S	P
1	WE-9241/93	1	0	1	1	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	1	1	0	0	0
2	WE-10742/89	0	1	1	0	0	0	0	0	1	1	1	0	0	0	1	1	1	1	1	1
3	WN-1098/97 (I)	1	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	1	1	0	0	0
	(II)	1	0	1	1	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	1	1	1	0	0	0
	(III)	1	0	1	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	1	1	0	0	0
4	WE-17883/95	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
5	WE-17376/93	0	0	1	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	1	1	0	0	0
6	WN-97/00	1	0	0	0	0	1	1	1	1	0	1	0	0	0	1	1	1	1	0	0
7	NE 1202/99	1	1	1	1	0	0	0	0	1	1	1	1	0	0	1	1	1	0	0	0
8	WN-545/97	1	1	1	1	0	0	0	0	1	0	1	0	0	0	1	1	1	0	0	0
9	WE-21466/93	1	1	1	0	0	0	0	0	1	1	1	0	0	0	1	1	1	0	0	0
10	WE-31016/86	1	1	1	1	0	0	0	0	1	0	1	0	0	0	1	1	1	0	0	0
11	WN-999/99 (I)	1	1	1	1	1	0	0	0	1	1	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	(II)	1	1	1	1	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	1	1	1	0	0
12	WN-154/98	1	1	1	1	0	0	0	0	1	1	1	0	0	0	1	1	1	1	0	0
13	WN-236/00 (I)	1	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	1	1	1	0	0
	(II)	1	1	0	0	0	0	0	0	1	1	1	0	0	0	1	1	1	1	0	0
14	NE 181/99	1	0	1	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
15	WE-18607/90(I)	1	0	1	0	0	0	0	0	1	1	1	0	0	0	1	1	1	0	0	0
	(II)	1	1	1	0	0	0	0	0	1	1	1	0	0	0	1	1	1	0	0	0
	(III)	1	0	1	0	0	0	0	0	1	1	1	0	0	0	1	1	1	0	0	0
16	WE-8422/93	1	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	1	1	0	0	0
17	ZN 98/116	1	0	1	1	0	0	0	0	1	1	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0
18	WE-8494/95	1	1	1	0	0	1	1	0	1	1	1	0	0	0	1	1	1	1	1	1
19	WE-11193/95	1	1	1	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	1	1	0	0	0
20	ZN 97/1285	1	1	1	1	0	0	0	0	1	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
21	WN-581/97	1	1	0	0	0	0	0	0	1	1	1	0	0	0	1	1	1	0	0	0
22	NE 921/00 (I)	1	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	(II)	1	1	0	0	0	0	0	0	1	1	1	0	0	0	1	1	1	0	0	0
23	WN-390/00 (I)	1	1	0	0	0	0	0	0	1	1	1	0	0	0	1	1	1	1	0	0
	(II)	1	0	0	0	0	0	0	0	1	1	1	0	0	0	1	1	1	1	0	0
24	WE-7464/96	1	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	1	1	0	0	0
25	WN-453/99 (I)	1	1	1	1	0	0	0	0	1	1	1	0	0	0	1	1	1	0	0	0
	(II)	1	0	1	1	0	0	0	0	1	1	1	0	0	0	1	1	1	0	0	0
26	NE 40/99	1	0	1	0	0	1	0	0	1	1	1	0	0	0	1	1	1	1	0	0
27	NE 122/00	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	NE 125/00	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0
28	NE 467/98	1	0	1	0	0	0	0	0	1	1	1	0	0	0	1	1	1	0	0	0
29	WN-854/98 (I)	1	0	1	1	0	1	0	0	1	1	1	1	0	0	1	1	1	0	0	0
	(II)	1	0	1	1	0	1	0	0	1	1	1	1	0	0	1	1	1	0	0	0
30	WN-735/00	1	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	1	1	0	0	0
31	WE-15468/93	1	1	1	1	0	0	0	0	1	1	1	0	0	0	1	1	1	0	0	0

Abkürzungen Tabelle 3:

E Endothel
 S Subendothel
 P Perivaskuläres Gewebe
 0 negative Immunreaktion
 1 positive Immunreaktion

3.2.3 Adulte Kontrollen

Die Präparate aus 14 Autopsien adulter Patienten stellen die Kontrollen zu dem adulten Patientengut der vorliegenden Studie dar und sind entsprechend der jeweiligen immunhistochemischen Protokolle mitgefärbt worden. Von den 14 Kontrollpräparaten wiesen 7 eine stattgehabte Blutung auf und 7 nicht. Dreizehn Präparate entstammten supratentorialen Hirnarealen, ein Präparat war im Kleinhirn lokalisiert. Als Zufallsbefund wurde in einem Sektionspräparat eine arteriovenöse Malformation gefunden.

Die immunhistochemischen Färbungen ergaben bei fast allen verwendeten Antikörpern weder eine endotheliale, noch eine subendotheliale oder perivaskuläre Immunreaktion. Eine Ausnahme hierzu stellt der Endoglin Antikörper dar, der in 8 teils gebluteten teils nicht gebluteten Präparaten eine positive Anfärbung zeigte. Bei Positivität für Anti-Endoglin erstreckte sich diese auf alle drei untersuchten Gefäßschichten. Des Weiteren gab es zwei positive Kontrollen für CD 31, eine bezüglich aller drei Gewebeschichten und eine weitere ausschliesslich endothelial. Das Präparat mit der zufällig gefundenen AVM zeigte als einziges eine positive Immunreaktion auf die Antikörper gegen PCNA, Flk-1 und Hif-1 α . Die Einzelergebnisse der Immunhistochemie der adulten Kontrollen sowie Angaben zu Lokalisation und Blutung sind Tabelle 4 zu entnehmen.

Tabelle 4 (Adulte Kontrollpräparate aus Sektionen)

Nr. Präparat-Nr.	Lokalisation	Blutung	Sonst.	PCNA	Mib-1	flk-1			VEGF			HIF 1 α			Tie-2			Endoglin			CD 31		
						E	S	P	E	S	P	E	S	P	E	S	P	E	S	P	E	S	P
1 NE 221/99	supratentoriell	ja		0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	1	1	0	0	0
2 NE 224/99	supratentoriell	nein		0	0	0	0	0	0	0	0	n.u.			0	0	0	1	1	1	0	0	0
3 NE 200/99	supratentoriell	ja		0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	1	1	0	0	0
4 NE 218/99	supratentoriell	nein		0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	1	1	1	1	1
5 NE 200/99	supratentoriell	ja		0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
6 NE 191/99	supratentoriell	ja		0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
7 NE 186/99	supratentoriell	ja		0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	1	1	0	0	0
8 NE 74/00	supratentoriell	nein		0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
9 NE 78/00	supratentoriell	ja		0	0	0	0	0	0	0	0	n.u.			0	0	0	1	1	1	0	0	0
10 NE 78/00	supratentoriell	nein		0	0	0	0	0	0	0	0	n.u.			0	0	0	0	0	0	1	0	0
11 NE 87/00	supratentoriell	ja	AVM	1	0	1	0	0	0	0	0	1	1	0	0	0	0	1	1	1	0	0	0
12 NE 207/99	supratentoriell	nein		0	0	0	0	0	0	0	0	n.u.			0	0	0	1	1	1	0	0	0
13 NE 215/99	supratentoriell	nein		0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
14 NE 189/99	infratentoriell	nein		0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0

Abkürzungen Tabelle 4:

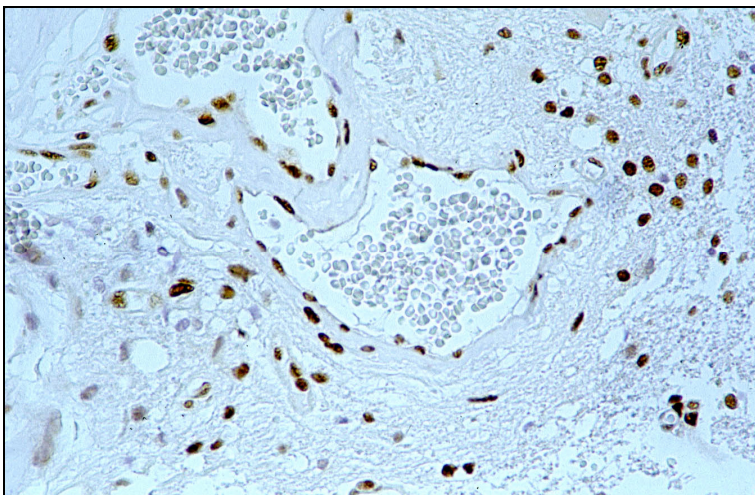
E Endothel
 S Subendothel
 P Perivaskuläres Gewebe
 n.u. nicht untersucht, da kein Material mehr vorhanden
 AVM Arteriovenöse Malformation
 0 negative Immunreaktion
 1 positive Immunreaktion

3.2.4 Adulte Kavernome

An den Präparaten der adulten Kavernompatienten wurden genau analog zu den pädiatrischen Fällen die gleichen immunhistochemischen Untersuchungen in den jeweils gleichen Gewebeschichten durchgeführt.

Die Ergebnisse der immunhistochemischen Färbungen der Präparate der 56 adulten Patienten der Studie sind in Tabelle 5 im Einzelnen aufgeschlüsselt, in Tabelle 6 in absoluten Zahlen und in prozentualen Angaben zusammengefasst, und in Graphik 6 sind sie in Form eines Balkendiagramms visualisiert und den prozentualen Ergebnissen der Gesamtheit der Patienten der vorliegenden Studie sowie dem ausschließlich pädiatrischen Patientengut gegenübergestellt. Im Einzelnen fand sich bei den 58 adulten Operationspräparaten eine positive nukleäre Immunreaktion für PCNA im Endothel der Läsionen in 48 Fällen (82,8%), wie in Abbildung 4 exemplarisch dargestellt.

Abbildung 4 (Positive Immunreaktion auf PCNA)

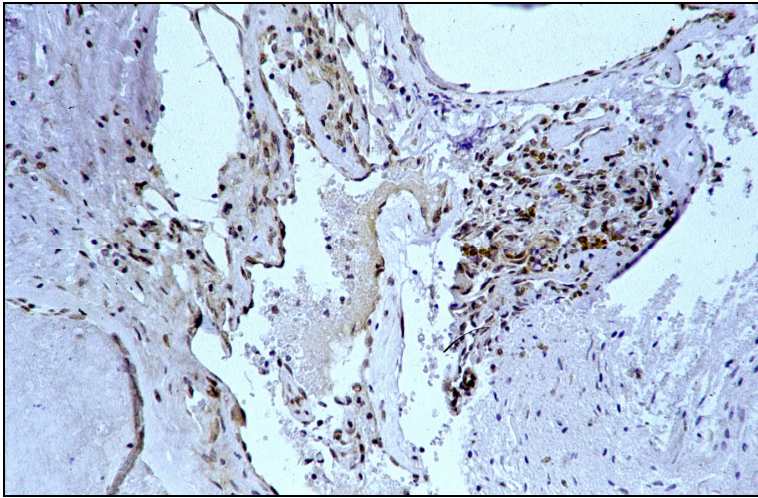


Kavernom ZN 98 138 eines adulten Patienten in 40-facher Vergrößerung.

Die positive nukleäre Immunreaktion im Endothel weist die Expression von PCNA nach.

Für MIB-1 konnte in 21 Fällen (36,2%) eine positive nukleäre Immunreaktion endothelial nachgewiesen werden. Eine positive Immunreaktion für Flk-1 wurde im Endothel in 39 Schnitten (68,0%), im Subendothel in 36 Schnitten (63,2%) und im perivaskulären Gewebe in 18 Schnitten (31,6%) detektiert. Abbildung 5 zeigt ein Präparat eines adulten Patienten mit positiver Flk-1 Expression in Endothel und Subendothel.

Abbildung 5 (Positive Immunreaktion auf Flk-1)

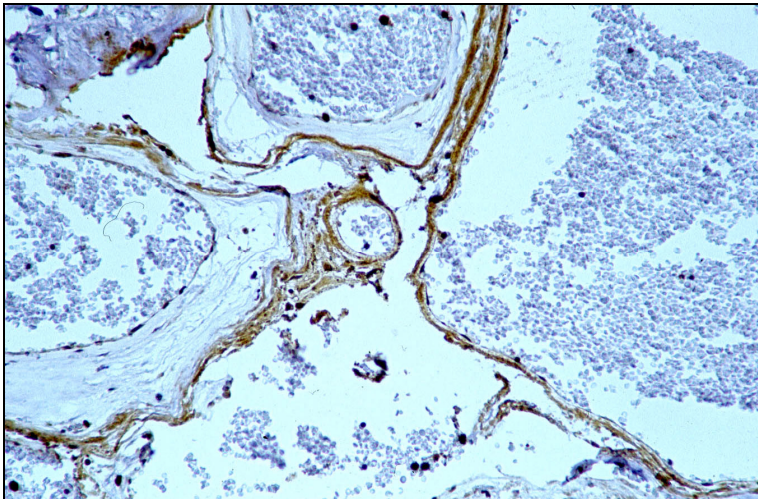


Kavernom ZN 97 770 eines adulten Patienten in 20-facher Vergrößerung.

Die positive Immunreaktion in Endothel und Subendothel weist die Expression von Flk-1 in diesen Gewebeschichten nach.

Für VEGF ergab sich eine endotheliale Positivität in 21 Fällen (36,2%), eine subendotheliale Positivität in 19 Fällen (32,8%) und eine perivaskuläre in 23 Fällen (40,0%). Ein Präparat mit positivem VEGF-Nachweis in allen drei untersuchten Gewebeschichten ist in Abbildung 6 dargestellt.

Abbildung 6 (Positive Immunreaktion auf VEGF)



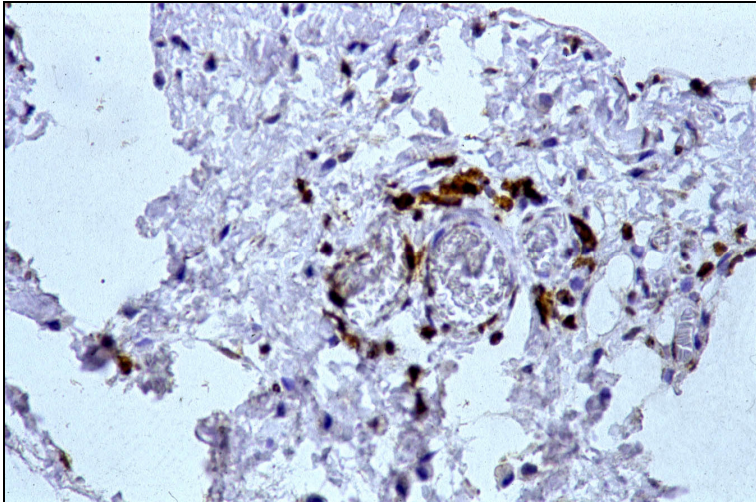
Kavernom NE 691/96 eines adulten Patienten in 20-facher Vergrößerung.

Die positive Immunreaktion in Endothel, Subendothel und perivaskulärem Gewebe weist die Expression von VEGF in diesen Gewebeschichten nach.

Eine Anfärbbarkeit durch den Hif-1 α -Antikörper konnte in 26 Präparaten (47,3%) endothelial, subendothelial und perivaskulär nachgewiesen werden. Ein positiver Befund für Hif-1 α konnte in allen Fällen entweder in allen drei untersuchten Gewebeschichten oder in keiner gefunden werden. Für Tie-2 wiesen jeweils 4 Fälle (7,3%) eine positive endotheliale und perivaskuläre

Expression auf. Subendothelial konnte Tie-2 in 5 Fällen (9,1%) detektiert werden. Der Illustration einer positiven Immunreaktion auf Tie-2 dient in Abbildung 7 aufgrund seiner besonderen Anschaulichkeit ein Kontrollpräparat humaner Plazenta. Diese wurde zur Etablierung des Tie-2 Versuchsprotokolls eingesetzt und war Positivkontrolle für diesen Antikörper.

Abbildung 7 (Positive Immunreaktion auf Tie-2)

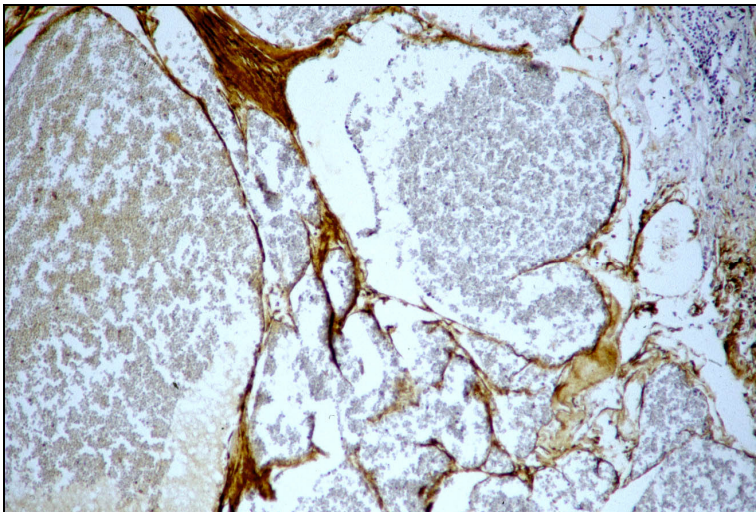


Kontrollpräparat humaner Plazenta in 40-facher Vergrößerung.

Die positive Immunreaktion in Endothel, Subendothel und perivaskulärem Gewebe weist die Expression von Tie-2 in diesen Gewebeschichten nach.

Eine positive Immunreaktion auf Endoglin konnte im Endothel von 35 Schnitten (61,4%) nachgewiesen werden. Subendothelial zeigten 34 Präparate (59,6%) eine Positivität und perivaskulär 31 Präparate (54,4%). Abbildung 8 zeigt ein in allen drei untersuchten Gewebeschichten endoglin-positives Präparat.

Abbildung 8 (Positive Immunreaktion auf Endoglin)

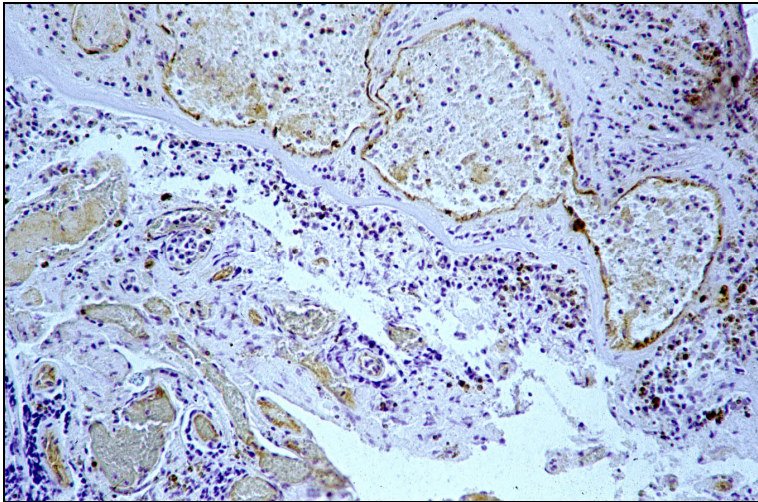


Kavernom NE 1073/99 eines adulten Patienten in 10-facher Vergrößerung.

Die positive Immunreaktion in Endothel, Subendothel und perivaskulärem Gewebe weist die Expression von Endoglin in diesen Gewebeschichten nach.

Der CD 31-Antikörper rief in 26 Fällen (47,3%) eine endotheliale Immunreaktion hervor. Im Subendothel zeigte sich in 14 Fällen (25,5%) und im perivaskulären Gewebe in 19 Fällen (34,5%) CD 31-Positivität. Eine positive Immunreaktion auf CD 31 ist in Abbildung 9 anhand eines Kavernompräparates eines adulten Patienten mit positiver CD 31 Expression in allen drei untersuchten Gewebeschichten illustriert.

Abbildung 9 (Positive Immunreaktion auf CD 31)



Kavernom NE 977/99 eines adulten Patienten in 20-facher Vergrößerung.

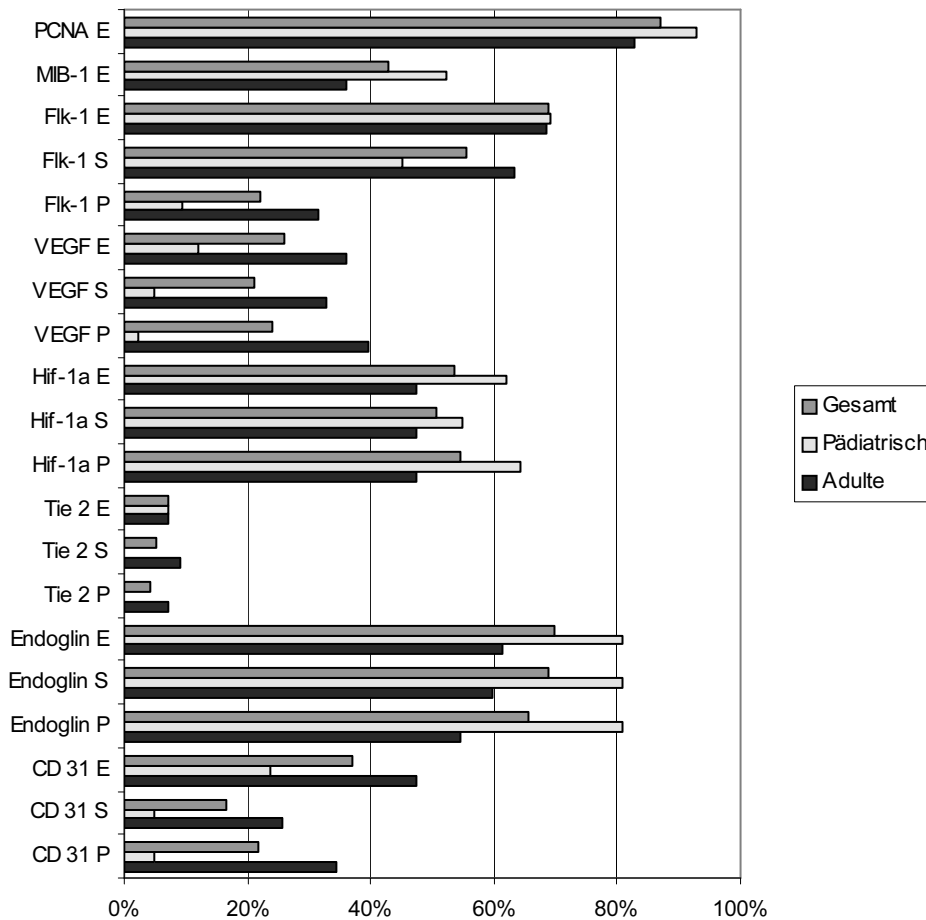
Die positive Immunreaktion in Endothel, Subendothel und perivaskulärem Gewebe weist die Expression von CD 31 in diesen Gewebeschichten nach.

Tabelle 5 (Adulte IHC Ergebnisse)

Nr.	Präparat-Nr.	PCNA			MIB-1			Flik-1			VEGF			HIF 1 a			Tie 2			Endoglin			CD 31		
		E	S	P	E	S	P	E	S	P	E	S	P	E	S	P	E	S	P	E	S	P	E	S	P
1	ZN 98 540	1			1	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	1	1			
2	NE 891/98	1	1		1	0	0	0	0	0	1	1	1	n.u.			0	0	0	n.u.					
3	ZN 98 452	1	1		1	1	0	0	0	0	1	1	1	0	0	0	1	1	0	1	1	1			
4	NE 691/96	1	0		1	1	1	1	1	1	1	1	1	0	0	0	1	1	1	1	0	1		-1	
5	NE 215/00	1	1		1	1	1	1	1	1	1	1	1	0	0	0	1	1	1	0	1	0	1	1	
6	NE 977/99	1	0		1	1	0	0	0	0	1	1	1	0	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	
7	NE 442/97	0	0		0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	
8	ZN 97 578	0	0		n.u.			0	0	1	0	0	0	1	1	1	0	0	1	1	1	1	1	1	
9	NE 652/99	1	1		1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	1	1	0	0	0	
10	NE 54/99	1	0		0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	
11	NE 578/97	1	0		1	1	1	1	1	1	1	1	1	0	0	0	1	1	1	1	1	1	1	1	
12	NE 598/00	1	0		1	1	0	0	1	1	1	1	1	0	0	0	1	1	0	1	0	1	0	1	
13	ZN 97 988	1	1		1	0	0	1	0	1	0	0	0	0	0	0	1	1	0	0	0	0	0	0	
14	ZN 98 138	1	1		0	1	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	1	0	1	0	
15	NE 528/99	1	1		1	1	0	0	0	1	1	1	1	0	0	0	1	1	1	0	0	0	0	0	
16	NE 346/98	1	0		1	1	1	0	0	0	1	1	1	0	0	0	1	1	1	0	0	0	0	0	
17	NE 249/00	0	0		0	0	0	0	0	0	n.u.			0	0	0	0	0	0	n.u.					
	NE 250/00	1	1		1	1	0	1	1	1	1	1	1	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	
18	NE 1187/99	1	0		0	0	0	0	0	0	1	1	1	n.u.			0	0	1	n.u.					
19	NE 336/97	1	0		0	0	0	1	1	1	0	0	0	0	0	0	1	1	1	0	0	1	0	1	
20	NE 1201/99	0	0		1	1	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	
21	NE 689/98	1	0		1	1	1	0	0	0	1	1	1	0	0	0	1	1	0	0	0	0	0	0	
22	ZN 97 1077	1	1		1	1	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	
23	NE 571/98	1	0		1	1	1	1	1	1	0	0	0	0	0	0	1	1	1	1	1	1	1	1	
24	NE 225/00	1	1		0	0	0	1	1	1	1	1	1	0	0	0	1	0	0	1	1	1	1	1	
25	NE 805/99	1	0		1	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	1	1	1	0	0	0	
26	NE 127/00	1	0		0	0	0	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	
27	ZN 97 770	1	0		1	1	0	1	1	1	1	1	0	0	0	0	0	0	1	1	1	1	0	0	
28	NE 895/98	1	0		0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	1	1	1	1	0	0	0	
29	NE 1140/98	1	0		1	1	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	
30	NE 638/97	1	0		0	0	0	1	1	1	1	1	1	0	0	0	1	1	1	1	1	0	0	0	
31	NE 557/97	0	1		0	0	0	0	0	0	n.u.			0	0	0	n.u.			0	0	0			
32	ZN 97 1237	1	0		0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	
33	NE 436/99	1	1		1	1	1	1	1	1	0	0	0	1	1	0	1	1	1	0	0	0	0	0	
34	NE 79/98	1	0		0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	1	1	0	0	0	0	0	
35	NE 220/99	0	0		0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	
36	NE 439/98	1	1		1	0	0	0	0	0	n.u.			0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	
37	NE 179/97	1	0		1	1	1	1	1	1	0	0	0	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	
38	NE 1160/98	1	1		1	1	0	0	0	0	1	1	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	
39	ZN 97 390	1	0		1	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	
40	ZN 98 159	1	1		1	1	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	1	1	1	1	0	0	0	0	
41	NE 1073/99	1	0		0	0	0	0	0	0	1	1	1	0	0	0	1	1	1	1	1	0	0	0	
42	ZN 97 496	1	1		1	1	1	0	0	0	1	1	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	
43	NE 472/98	1	0		0	0	0	1	1	1	1	1	1	0	0	0	1	1	1	1	1	1	1	1	
44	NE 1110/98	0	0		0	0	0	1	1	1	0	0	0	0	0	0	1	1	1	1	1	0	0	0	
45	ZN 98 1517	1	0		1	1	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	1	0	1	0	
46	NE 243/00	1	1		1	1	1	0	1	1	1	1	1	0	0	0	1	1	1	1	1	0	0	0	
47	ZN 98 111	1	1		1	1	1	1	1	1	1	1	1	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	
48	NE 1119/98	1	1		1	1	1	1	1	1	0	0	0	0	0	0	1	1	1	1	1	1	1	1	
49	NE 807/97	0	0		1	1	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	
50	NE 510/97	1	0		1	1	1	1	1	1	1	1	1	0	0	0	1	1	1	1	1	1	1	1	
51	NE 357/99	1	1		1	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	1	1	1	1	0	1		
52	NE 112/00	1	0		1	1	0	0	0	0	1	1	1	0	0	0	1	1	0	1	1	1	1	1	
53	NE 63/00	1	1		1	1	0	0	0	0	1	1	1	0	0	0	1	1	1	0	0	0	0	0	
54	ZN 97 858 (I)	1	0		1	1	1	0	0	0	1	1	1	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	
55	NE 1081/99	1	0		1	0	0	0	0	0	1	1	1	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	
56	NE 110/99	0	0		1	1	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	1	1	1	0	0	0	
	NE 112/99	0	0		0	0	0	0	0	0	0	0	0	n.u.			0	0	0	0	0	0	0	0	

Abkürzungen Tabelle 5:

E	Endothel
S	Subendothel
P	Perivaskuläres Gewebe
n.u.	nicht untersucht, da kein Material mehr vorhanden
0	negative Immunreaktion
1	positive Immunreaktion

Graphik 6 (Positive Antigen-Expression)

3.2.5 Korrelationen

Die Auswertung der immunhistochemischen Untersuchungen sowie der klinischen Daten zu den adulten Patienten der Studie ergab einige interessante Korrelationen, die im Folgenden vorgestellt werden.

Eine nach Patientensubgruppen aufgeteilte Synopsis der immunhistochemischen Ergebnisse der Studie in Prozentangaben und in ganzen Zahlen stellt Tabelle 6 dar.

Tabelle 6 (IHC nach Untergruppen)

Nr.				PCNA	MIB-1	Fik-1			VEGF			Hif-1a			Tie 2			Endoglin			CD 31		
				E	E	E	S	P	E	S	P	E	S	P	E	S	P	E	S	P	E	S	P
1	Gesamt	Positiv	%	87	43	68,7	55,6	22,2	26	21	24	53,6	50,5	54,6	7,2	5,2	4,1	69,7	68,7	65,7	37,1	16,5	21,6
		Positiv	n	87	43	68	55	22	26	21	24	52	49	53	7	5	4	69	68	65	36	16	21
		Gesamt	n	100	100	99	99	99	100	100	100	97	97	97	97	97	97	99	99	99	97	97	97
2	Pädiatrisch (gesamt)	Positiv	%	92,9	52,4	69	45,2	9,5	11,9	4,8	2,4	61,9	54,8	64,3	7,1	0	0	81	81	81	23,8	4,8	4,8
		Positiv	n	39	22	29	19	4	5	2	1	26	23	27	3	0	0	34	34	34	10	2	2
		Gesamt	n	42	42	42	42	42	42	42	42	42	42	42	42	42	42	42	42	42	42	42	42
3	Pädiatrisch (0-5 Jahre)	Positiv	%	100	50	55,6	38,9	16,7	5,6	5,6	5,6	50	44,4	55,6	0	0	0	94,4	94,4	94,4	33,3	0	0
		Positiv	n	18	9	10	7	3	1	1	1	9	8	10	0	0	0	17	17	17	6	0	0
		Gesamt	n	18	18	18	18	18	18	18	18	18	18	18	18	18	18	18	18	18	18	18	18
4	Adulte (gesamt)	Positiv	%	82,8	36,2	68,4	63,2	31,6	36,2	32,8	39,7	47,3	47,3	47,3	7,3	9,1	7,3	61,4	59,6	54,4	47,3	25,5	34,5
		Positiv	n	48	21	39	36	18	21	19	23	26	26	26	4	5	4	35	34	31	26	14	19
		Gesamt	n	58	58	57	57	57	58	58	58	55	55	55	55	55	55	57	57	57	55	55	55
5	Adulte (> 55 Jahre)	Positiv	%	88,9	66,7	77,8	88,9	55,6	77,8	55,6	55,6	22,2	22,2	22,2	11,1	11,1	0	66,7	66,7	55,6	33,3	11,1	22,2
		Positiv	n	8	6	7	8	5	7	5	5	2	2	2	1	1	0	6	6	5	3	1	2
		Gesamt	n	9	9	9	9	9	9	9	9	9	9	9	9	9	9	9	9	9	9	9	9
6	Männlich (gesamt)	Positiv	%	91,7	43,8	70,2	57,4	23,4	22,9	14,6	18,8	56,5	52,2	58,7	8,3	6,3	6,3	74,5	76,6	70,2	35,4	16,7	22,9
		Positiv	n	44	21	33	27	11	11	7	9	26	24	27	4	3	3	35	36	33	17	8	11
		Gesamt	n	48	48	47	47	47	48	48	48	46	46	46	48	48	48	47	47	47	48	48	48
7	Männlich (adult)	Positiv	%	88	40	66,7	66,7	33,3	32	24	32	52,2	52,2	52,2	8	12	12	62,5	66,7	54,2	56	32	44
		Positiv	n	22	10	16	16	8	8	6	8	12	12	12	2	3	3	15	16	13	14	8	11
		Gesamt	n	25	25	24	24	24	25	25	25	23	23	23	25	25	25	24	24	24	25	25	25
8	Männlich (pädiatrisch)	Positiv	%	95,7	47,8	73,9	47,8	13	13	4,3	4,3	60,9	52,2	65,2	8,7	0	0	87	87	87	13	0	0
		Positiv	n	22	11	17	11	3	3	1	1	14	12	15	2	0	0	20	20	20	3	0	0
		Gesamt	n	23	23	23	23	23	23	23	23	23	23	23	23	23	23	23	23	23	23	23	23
9	Weiblich (gesamt)	Positiv	%	82,7	42,3	67,3	53,8	21,2	28,8	26,9	28,8	51	49	51	6,1	4,1	2	65,4	61,5	61,5	38,8	16,3	20,4
		Positiv	n	43	22	35	28	11	15	14	15	26	25	26	3	2	1	34	32	32	19	8	10
		Gesamt	n	52	52	52	52	52	52	52	52	51	51	51	49	49	49	52	54	52	49	49	49
10	Weiblich (adult)	Positiv	%	78,8	33,3	69,7	60,6	30,3	39,4	39,4	45,5	43,8	43,8	43,8	6,7	6,7	3,3	60,6	54,5	54,5	40	20	26,7
		Positiv	n	26	11	23	20	10	13	13	15	14	14	14	2	2	1	20	18	18	12	6	8
		Gesamt	n	33	33	33	33	33	33	33	33	32	32	32	30	30	30	33	33	33	30	30	30
11	Weiblich (pädiatrisch)	Positiv	%	89,5	57,9	63,2	42,1	5,3	10,5	5,3	0	63,2	57,9	63,2	5,3	0	0	73,7	73,7	73,7	36,8	0	0
		Positiv	n	17	11	12	8	1	2	1	0	12	11	12	1	0	0	14	14	14	7	2	2
		Gesamt	n	19	19	19	19	19	19	19	19	19	19	19	19	19	19	19	19	19	19	19	19
12	Weiblich (14-40 Jahre) (Hormone)	Positiv	%	84,2	42,1	68,4	36,8	21,1	31,6	26,3	31,6	42,1	42,1	42,1	5,6	5,6	5,6	68,4	68,4	63,2	42,1	21,1	21,1
		Positiv	n	16	8	13	7	4	6	5	6	8	8	8	1	1	1	13	13	12	8	4	4
		Gesamt	n	19	19	19	19	19	19	19	19	19	19	19	19	19	19	19	19	19	18	18	18
13	Positive Krampf-anamnese	Positiv	%	94,1	29,4	62,5	50	25	58,8	47,1	58,8	29,4	29,4	29,4	23,5	23,5	17,6	76,5	82,4	70,6	58,8	35,3	47,1
		Positiv	n	16	5	10	8	4	10	8	10	5	5	5	4	4	3	13	14	12	10	6	8
		Gesamt	n	17	17	16	16	16	17	17	17	17	17	17	17	17	17	17	17	17	17	17	17
14	Negative Krampf-anamnese	Positiv	%	78	39	70,7	68,3	34,1	26,8	26,8	31,7	55,3	55,3	55,3	0	2,6	2,6	55	50	47,5	42,1	21,1	28,9
		Positiv	n	32	16	29	28	14	11	11	13	21	21	21	0	1	1	22	20	19	16	8	11
		Gesamt	n	41	41	41	41	41	41	41	41	38	38	38	38	38	38	40	40	40	38	38	38
15	Oberflächlich (A)	Positiv	%	92	36	62,5	54,2	29,2	60	48	56	44	44	44	12	12	12	76	80	68	60	36	48
		Positiv	n	23	9	15	13	7	15	12	14	11	11	11	3	3	3	19	20	17	15	9	12
		Gesamt	n	25	25	24	24	24	25	25	25	25	25	25	25	25	25	25	25	25	25	25	25
16	Tief (B)	Positiv	%	75	39,3	71,4	67,9	32,1	17,9	21,4	28,6	46,2	46,2	46,2	4	8	4	51,9	48,1	48,1	38,5	19,2	26,9
		Positiv	n	21	11	20	19	9	5	6	8	12	12	12	1	2	1	14	13	13	10	5	7
		Gesamt	n	28	28	28	28	28	28	28	28	26	26	26	25	25	25	27	27	27	26	26	26
17	Hirnstamm (B6)	Positiv	%	78,6	21,4	57,1	57,1	21,4	7,1	14,3	14,3	46,2	46,2	46,2	0	8,3	8,3	46,2	38,5	38,5	33,3	25	33,3
		Positiv	n	11	3	8	8	3	1	2	2	6	6	6	0	1	1	6	5	5	4	3	4
		Gesamt	n	14	14	14	14	14	14	14	14	13	13	13	12	12	12	13	13	13	12	12	12
18	LCMOH >= 6 Monate	Positiv	%	92,9	28,6	78,6	71,4	42,9	50	50	64,3	53,8	53,8	53,8	7,7	7,7	0	71,4	64,3	78,6	30,8	23,1	30,8
		Positiv	n	13	4	11	10	6	7	7	9	7	7	7	1	1	0	10	9	11	4	3	4
		Gesamt	n	14	14	14	14	14	14	14	14	13	13	13	13	13	13	14	14	14	13	13	13
19	LCMOH <= 2 Monate	Positiv	%	75	50	62,5	68,8	31,3	25	18,8	18,8	46,7	46,7	46,7	6,7	6,7	6,7	46,7	53,3	33,3	40	26,7	33,3
		Positiv	n	12	8	10	11	5	4	3	3	7	7	7	1	1	1	7	8	5	6	4	5
		Gesamt	n	16	16	16	16	16	16	16	16	16	15	15	15	15	15	15	15	15	15	15	15

Abkürzungen Tabelle 6:

E Endothel
 S Subendothel
 P Perivaskuläres Gewebe
 positiv positive Immunreaktion
 LCMOH Last Clinical Manifestation Of Hemorrhage

3.2.5.1 Männliche vs. weibliche Patienten

Zur Überprüfung eines in der Literatur beschriebenen Zusammenhangs der Kavernommanifestation mit hormonellen Veränderungen bei Frauen wurden die immunhistochemischen Ergebnisse aller männlichen Patienten zunächst mit denen aller weiblichen Patienten verglichen und unter anderem auch den Ergebnissen der weiblichen Patienten der Altersgruppe 14-40 Jahre, in der von einer ausgeprägten Sekretion weiblicher Geschlechtshormone auszugehen ist, gegenübergestellt. Sowohl bei dem weiblichen Gesamtkollektiv als auch in der o.g. Gruppe weiblicher Patienten mit ausgeprägter Hormonaktivität zeigen sich im Vergleich zum männlichen Gesamtkollektiv der Studie ähnliche prozentuale IHC-Ergebnisse mit teilweise geringen Abweichungen, die sicher keine statistische Signifikanz aufweisen. Ebenso verhält es sich, wenn man die männlichen und weiblichen Patienten jeweils in die Subgruppen pädiatrisch und adult unterteilt und einander gegenüberstellt. Die genauen Zahlenwerte der Untersuchungen bei den beschriebenen nach Geschlecht aufgeteilten Patientenuntergruppen sind Tabelle 6 zu entnehmen.

3.2.5.2 Klinik adulter vs. IHC adulter Patienten

Bei der Betrachtung der immunhistochemischen Ergebnisse der adulten Patienten in Verbindung mit den dazugehörigen klinischen Angaben fanden sich die folgenden statistisch signifikanten Korrelationen.

3.2.5.2.1 Krampfanamnese

Bei der Korrelation der adulten Patienten mit positiver Krampfanamnese gegenüber denen mit negativer Krampfanamnese war eine höhere prozentuale Antigenexpression bei den Patienten ohne Krampfanfall in der Vorgeschichte für die Antikörper MIB-1, Flk-1 und Hif-1 α in allen untersuchten Gewebsschichten zu verzeichnen, die jedoch nicht statistisch signifikant war ($p>0,05$). Für alle anderen untersuchten Antikörper ergab sich eine höhere

prozentuale Antigenexpression in allen untersuchten Schichten für die Patienten mit stattgehabtem Krampfanfall.

Als statistisch signifikante Ergebnisse sind hierunter folgende Korrelationen hervorzuheben: Die endotheliale VEGF-Expression betrug 58,8% bei Patienten mit positiver Krampfanamnese gegenüber 26,8% bei denen ohne Krampfereignis mit einem p-Wert von $p=0,0282$. Für Tie-2 war eine Positivität von 23,5% bei Patienten mit Krampfanfall in der Anamnese gegenüber keinerlei Tie-2 Expression bei Patienten mit leerer Krampfanamnese zu verzeichnen, der p-Wert hierzu beträgt $p=0,0286$. Eine weitere statistisch relevante Korrelation ergab sich für die subendotheliale Endoglinexpression mit 82,4% bei Patienten mit positiver gegenüber 50% bei Patienten mit negativer Krampfanamnese und einem p-Wert von $p=0,0267$.

Die IHC-Ergebnisse der vorbeschriebenen Untergruppen sowohl in Prozentangaben als auch in ganzen Zahlen sind Tabelle 6 zu entnehmen.

3.2.5.2.2 Lokalisation

Zur Aufklärung von Zusammenhängen zwischen Kavernomlokalisierung und Antigenexpression wurden die Ergebnisse der Immunhistochemie der Patienten mit oberflächlich gelegenen Kavernomen den Ergebnissen der Patienten mit tiefen Läsionen und der Patienten mit Kavernomen des Hirnstamms gegenübergestellt.

Es konnte eine signifikant höhere endotheliale VEGF-Expression bei Patienten mit oberflächlichen Läsionen von 60% gegenüber Patienten mit tiefen Kavernomen von 17,9 % bei einem Signifikanzniveau von $p=0,0042$ festgestellt werden. Die subendotheliale Endoglinexpression betrug bei oberflächlichen Läsionen 80% verglichen mit 48,1% bei tiefen Kavernomen und einem p-Wert von $p=0,0204$.

Bei der Korrelation der oberflächlichen Läsionen mit Hirnstammkavernomen ergaben sich gleichartige Ergebnisse wie beim Vergleich mit tiefen Kavernomen, die jedoch eine noch höhere statistische Signifikanz mit deutlich niedrigeren p-Werten aufweisen. Die VEGF-Expression ist in allen drei

untersuchten Schichten bei den oberflächlichen gegenüber den tiefen Kavernomen erhöht. Im Einzelnen lauten die Resultate für VEGF endothelial 60% vs. 7,1% mit $p=0,0034$, subendothelial 48% vs. 14,3% mit $p=0,0469$ und perivascular 56% vs. 14,3% mit $p=0,0151$.

Die subendotheliale Endoglinexpression ist mit 80% in oberflächlichen Läsionen gegenüber 38,5% in Kavernomen des Hirnstamms mit einem p-Wert von $p=0,0143$ ebenfalls signifikant erhöht.

Für die weiteren untersuchten Antikörper und Gewebsschichten konnte kein signifikanter Unterschied hinsichtlich der Lokalisation der untersuchten Kavernome nachgewiesen werden. Die entsprechenden Auswertungen der Immunhistochemie aller untersuchten Antikörper und Schichten für die besprochenen Untergruppen nach Lokalisation sind ebenfalls in Tabelle 6 zusammengefasst.

3.2.5.2.3 Blutungen / LCMOH

Es soll untersucht werden, ob zu unterschiedlichen Zeitpunkten stattgefunden klinisch manifeste Blutungen der untersuchten Läsionen einen Einfluss auf die Antigenexpression in diesen Läsionen haben. Hierzu wurden die immunhistochemischen Ergebnisse von Patienten mit einem Blutungsereignis in der Anamnese, das 6 Monate oder länger vor dem Operationszeitpunkt zurückliegt (>6 Mon.), den Ergebnissen der Patienten gegenübergestellt mit einer Blutung, die 2 Monate oder weniger vor der Operation stattgefunden hat (<2 Mon.).

Die MIB-1-Expression lag in der Gruppe >6 Mon. mit 28,6% deutlich unter dem Wert der Gruppe <2 Mon. mit 50%, wobei dieses Ergebnis mit $p=0,2613$ keine statistische Signifikanz aufweist.

VEGF wird in allen drei untersuchten Gewebsschichten bei den Patienten mit einer 6 Monate oder länger zurückliegenden Blutung häufiger exprimiert als bei Patienten mit einer 2 Monate oder kürzer zurückliegenden Blutung vor der Operation. Die Resultate bezüglich des Endothels mit 50% (>6 Mon.) zu 25% (<2 Mon.) und einem Signifikanzniveau von $p=0,2024$ sowie bezüglich des

Subendothels mit 50% zu 18,8% und $p=0,1040$ besitzen keine Signifikanz. Die VEGF-Expression im perivaskulären Gewebe ist mit 64,3% gegenüber 18,8% und einem p-Wert von $p=0,0175$ statistisch signifikant.

Des Weiteren liegt die perivaskuläre Endoglin-Expression in der Gruppe >6 Mon. mit 78,6% signifikant über dem Ergebnis von 33,3% in der Gruppe <2 Mon.. Das Signifikanzniveau dieser Korrelation beträgt $p=0,0184$.

Die Einzelergebnisse der immunhistochemischen Färbungen der nach Blutungsereignissen unterteilten Patientensubgruppen sind aus Tabelle 6 ersichtlich.

3.2.5.3 Pädiatrische vs. adulte Kavernome

Die Untersuchung und Gegenüberstellung möglicher Unterschiede in der Antigenexpression von Kavernomen adulter und pädiatrischer Patienten ist ein Hauptaspekt der vorliegenden Arbeit. Zu diesem Zweck wurden zunächst die Ergebnisse aller pädiatrischen Patienten den Ergebnissen aller adulten Patienten der Studie gegenübergestellt. In einem zweiten Schritt wurde eine weitere Differenzierung in die Altersgruppen junge pädiatrische Patienten (0-5 Jahre) und ältere adulte Patienten (>55 Jahre) vorgenommen und miteinander verglichen, um so mögliche Unterschiede in diesen extrem weit auseinanderliegenden Altersgruppen zu detektieren.

3.2.5.3.1 Pädiatrische gesamt vs. adulte gesamt

Es fiel auf, dass bei annähernd gleich häufiger endothelialer Flk-1-Expression von 69% in der pädiatrischen Gruppe und 68,4% unter den adulten Patienten, die pädiatrischen Patienten eine signifikant niedrigere Flk-1-Expression im perivaskulären Gewebe von 9,5% gegenüber 31,6% bei den adulten Patienten aufweisen. Der zugehörige p-Wert beträgt $p=0,0229$.

Die VEGF-Expression ist im adulten Patientenkollektiv gegenüber dem pädiatrischen in allen untersuchten Gewebeschichten signifikant erhöht. Im

Endothel sind 36,2% der adulten gegenüber 11,9% der pädiatrischen Patienten VEGF-positiv mit einem p-Wert von $p=0,0146$, im Subendothel beträgt das entsprechende Verhältnis 32,8% zu 4,8% mit einem p-Wert von $p=0,0039$, und im perivaskulären Gewebe war eine Positivität von 39,7% zu 2,4% und $p=0,0020$ nachweisbar.

Für Endoglin konnte bei den pädiatrischen Patienten eine Antigenexpression in 81% der Fälle in allen drei untersuchten Gewebeschichten nachgewiesen werden. Bei den adulten Patienten lag der Anteil der Endoglin-Positivität mit 61,4% im Endothel, 59,6% im Subendothel und 54,4% im perivaskulären Gewebe deutlich niedriger. Mit p-Werten von $p=0,0382$, respektive $p=0,0107$ sind die subendothelialen und perivaskulären Differenzen statistisch signifikant. Der CD 31-Antikörper detektierte eine deutlich höhere prozentuale CD 31-Antigenexpression bei den adulten gegenüber den pädiatrischen Patienten. Im Endothel ergab sich eine Positivität von 47,3% gegenüber 23,8% und $p=0,0241$, subendothelial 25,5% zu 4,8% mit $p=0,0228$ und perivaskulär 34,5% zu 4,8% mit $p=0,0030$.

Für die anderen untersuchten Antikörper ergaben sich keine relevanten Differenzen in der Antigenexpression zwischen pädiatrischen und adulten Patienten.

Die Untersuchungsdaten im Einzelnen sind Tabelle 6 zu entnehmen.

3.2.5.3.2 Pädiatrische (0-5 Jahre) vs. adulte (>55 Jahre)

Die Gegenüberstellung dieser beiden extrem weit auseinanderliegenden Altersgruppen soll überprüfen ob sich noch extremere Unterschiede als bei der Korrelation Pädiatrische gesamt vs. Adulte gesamt ergeben, und ob es spezifische Besonderheiten in der Antigenexpression bei extrem jungen pädiatrischen Patienten und älteren adulten Patienten gibt.

Die Flk-1-Expression ist bei den Patienten >55 Jahre sowohl prozentual häufiger nachweisbar als bei den gesamten adulten Patienten der vorliegenden Studie als auch bei den pädiatrischen Patienten <5 Jahre. Mit einer relativen Häufigkeit von 88,9% bei Patienten über 55 Jahre gegenüber 38,9% bei

Patienten unter 5 Jahre und einem p-Wert von $p=0,0213$ ist der gemessene Unterschied im subendothelialen Gewebe statistisch signifikant.

Auch die VEGF-Expression nimmt gemäß der vorliegenden Untersuchungsergebnisse mit zunehmendem Alter an Häufigkeit zu. Während sich im adulten Gesamtkollektiv prozentuale Häufigkeiten für VEGF-Positivität zwischen 30% und 40% in den unterschiedlichen Gewebeschichten ergeben, liegt die Häufigkeit dafür im adulten Patientengut >55 Jahre bei Werten zwischen 55% und 80%. Korreliert man die hohen Werte für VEGF-Expression von 77,8% endothelial sowie 55,6% subendothelial und perivascular in der Altersgruppe >55 Jahre mit den Werten der pädiatrischen Subgruppe <5 Jahre von 5,6% in allen untersuchten Schichten, so ist der festgestellte Unterschied in allen 3 Gewebeschichten signifikant mit p-Werten von $p=0,0022$ (endothel) und $p=0,0184$ (subendotheliales und perivaskuläres Gewebe).

Die weiteren immunhistochemischen Befunde für die untersuchten Patientensubgruppen und Antikörper weisen keine statistische Signifikanz auf. Eine Zusammenschau aller erhobenen Ergebnisse in Prozentangaben und in ganzen Zahlen stellt Tabelle 6 dar.

4 Diskussion

Die vorgestellten Ergebnisse werden analog der in der Einleitung verwendeten Systematik in die internationale Literatur eingeordnet und diskutiert. Dabei finden im ersten Unterkapitel ausschließlich klinische Aspekte Berücksichtigung, bevor dann im zweiten Abschnitt die experimentellen Gesichtspunkte diskutiert werden. Daran anschließend werden die wesentlichen Schlussfolgerungen aus der vorliegenden Studie besprochen, und es wird ein Ausblick auf mögliche Folgeprojekte auf dem Studiengebiet gegeben.

4.1 Klinische Aspekte

4.1.1 Epidemiologie

Aus der vorliegenden Arbeit lassen sich keine Aussagen zur Epidemiologie cerebraler Kavernome herleiten, da die in die Studie eingeschlossenen Patienten aus Deutschland und der Schweiz weder einen repräsentativen Querschnitt der deutschen noch der europäischen Bevölkerung widerspiegeln. In Marburg sowie in den anderen Kliniken, aus denen Studienpräparate rekrutiert wurden, liegen Behandlungszentren für cerebrale Kavernome. Aufgrund der daraus resultierenden überregionalen Zuweisungspolitik weisen diese Kliniken überdurchschnittlich hohe Fallzahlen für diese Erkrankung auf. Auch das Verhältnis von 31 pädiatrischen Patienten (35,6%) zu 56 adulten Patienten (64,4%) ist nicht repräsentativ für die Prävalenz der Kavernomerkrankung in der Bevölkerung. Mottolese et al. berichten, dass etwa ein Viertel der dokumentierten Läsionen in der pädiatrischen Altersgruppe auftreten [Mottolese et al. 2001]. Der vergleichsweise hohe Anteil pädiatrischer Patienten resultiert erstens aus der Spezialisierung der Universitätsklinik Würzburg auf pädiatrische cerebrale Kavernome und der damit verbundenen hohen Fallzahl und zweitens aus der relativ weit gefassten Definition pädiatrischer Erkrankungen mit einer Altersspanne von 0-19 Jahren.

4.1.2 Klinische Symptomatik

Die Angaben zur klinischen Symptomatik der Patienten der vorliegenden Studie beziehen sich ausschließlich auf die adulten Patienten, da die klinischen Daten des größten Teils der pädiatrischen Patienten zum Auswertungszeitpunkt nicht zur Verfügung standen. Da sich aus den wenigen pädiatrischen Patienten, deren klinische Daten vorliegen, keine repräsentativen und/oder signifikanten Aussagen treffen lassen, musste aufgrund einer zu niedrigen Fallzahl auf die Auswertung der klinischen Daten des pädiatrischen Patientenguts verzichtet werden.

Die Blutungsanamnese von 50 der 56 adulten Fälle ist bekannt. Nur einer dieser Patienten hat präoperativ nicht geblutet. Bei den übrigen 49 Patienten liegt das Intervall zwischen einer stattgehabten Blutung und der Operation zwischen einem Tag und drei Jahren, bei 70% von ihnen liegt die letzte klinisch manifeste Blutung weniger als sechs Monate zurück. Das täuscht auf den ersten Blick eine enorm hohe Blutungsrate vor, ist jedoch so nicht richtig, da es sich um eine immunhistochemische Arbeit an Operationspräparaten und damit um ausschließlich chirurgische Patienten handelt, die nicht repräsentativ für das Gesamtkollektiv der an cerebralen Kavernomen erkrankten Patienten sind. Eine klinisch manifeste Blutung stellt eine wichtige Operationsindikation dar, zum einen aufgrund der durch die Blutung verursachten vielfältigen Symptomatik, und zum anderen, weil das Risiko einer Rezidivblutung bei bereits gebluteten Kavernomen deutlich höher ist als bei zuvor nicht gebluteten Läsionen [Kondziolka et al. 1995, Alexander et al. 1998]. Blutungsraten werden in der Literatur von 0,25%/Jahr [Del Curling et al. 1991] über 0,7%/Jahr [Robinson et al. 1991] bis hin zu einer retrospektiven Rate von 1,3%/Jahr [Kondziolka et al. 1995] angegeben. Ein auf ein Jahr bezogenes Blutungsrisiko ist aus den Daten der vorliegenden Arbeit nicht eruierbar.

Die klinische Symptomatik ist nur bei acht Patienten monosymptomatisch auf das Auftreten eines oder mehrerer Krampfanfälle beschränkt. Ein Patient, dessen Läsion einen Zufallsbefund darstellt, ist asymptomatisch. Bei der überwiegenden Mehrheit von 83,9% der Patienten liegen multiple Symptome vor. Der Anteil an Patienten mit neurologischen Defiziten von 78,6% liegt deutlich über dem in der

Literatur angegebenen Anteil von 12-50% [Del Curling et al. 1991, Giombini u. Morello 1978, Kondziolka et al. 1995, Lunsford et al. 1991, McCormick et al. 1968, Moriarity et al. 1999, Robinson et al. 1991, Robinson et al. 1993, Zambramski et al. 1994, Zimmerman et al. 1991]. Auch dieser Unterschied ist möglicherweise durch die Tatsache erklärbar, dass in die vorliegende Studie ausschließlich chirurgische Patienten mit entsprechenden Operationsindikationen wie z.B. neurologische Defizite und andere Blutungsmanifestationen eingeschlossen sind.

Krampfanfälle sind mit 30,4% im eigenen Patientengut seltener als mit 38-60% in der Literatur angegeben [Del Curling et al. 1991, Giombini u. Morello 1978, Kondziolka et al. 1995, Lunsford et al. 1991, McCormick et al. 1968, Moriarity et al. 1999, Robinson et al. 1991, Robinson et al. 1993, Zambramski et al. 1994, Zimmerman et al. 1991]. Das könnte daran liegen, dass das Vorliegen eines medikamentös beherrschbaren Anfallsleidens eine weniger starke Operationsindikation als das Vorliegen neurologischer Defizite darstellt, und somit viele Patienten mit epileptischen Krampfanfällen konservativ behandelt werden können. Zufallsbefunde cerebraler Kavernome oder Patienten, die ohne vorherige Blutung an Konvulsionen leiden, haben eine sehr niedrige Blutungsrate [Del Curling et al. 1991, Robinson et al. 1991, Robinson et al. 1993]. Insgesamt lässt sich feststellen, dass die meisten Patienten der Studie unter vergleichsweise starken und häufig multiplen Symptomen litten, was dadurch zu erklären ist, dass in die vorliegende Studie ausschließlich chirurgische Patienten eingeschlossen sind, und dass die Art und der Ausprägungsgrad der Symptomatik ein wichtiges Kriterium für die Operationsindikation darstellen.

4.1.3 Alter und Geschlecht

Die Altersspanne für das Auftreten bzw. die Diagnosestellung von Kavernomen wird in der Literatur mit vom Neugeborenenalter bis in die neunte Lebensdekade hinein mit einem Median von 34 Jahren angegeben [Robinson u. Awad 1993]. Das stimmt mit der Altersverteilung der 87 Patienten der

vorliegenden Arbeit weitestgehend überein, die zum Operationszeitpunkt von unter einem Jahr bis zu 74 Jahren alt waren. Das Durchschnittsalter aller Patienten dieser Studie beträgt 30,3 Jahre. 54% der operierten Patienten waren zwischen 20 und 54 Jahren alt, was die Aussage von Hsu et al. bestätigt, dass die grösste Inzidenz zwischen dem dritten und fünften Lebensjahrzehnt auftritt [Hsu et al. 1993].

Die Geschlechtsverteilung ist in der vorliegenden Studie mit 52,9% weiblichen (46 Pat.) zu 47,1% männlichen Fällen (41 Pat.) annähernd ausgeglichen. Die Mehrzahl der publizierten Studien mit großen Fallzahlen geht ebenfalls von einem ausgeglichenen Geschlechtsverhältnis aus [Del Curling et al. 1991, Hsu et al. 1993, Porter et al. 1997, Robinson et al. 1991, Sage et al. 1993]. Nur wenige Autoren berichten über eine Bevorzugung des männlichen Geschlechts [Giombini u. Morello 1978] gegenüber dem weiblichen [Simard et al. 1986, Vaquero et al. 1987].

4.1.4 Lokalisationen

Auch die Daten zu den Lokalisationen der operierten Läsionen beziehen sich aus oben genannten Gründen ausschließlich auf das adulte Patientengut der vorliegenden Arbeit.

Rückenmarkskavernome kommen nicht ganz so selten vor wie vor der MRT-Ära angenommen [Cosgrove et al. 1988, Lee u. Spetzler 1990, Pagni et al. 1990, Zevgaridis et al. 1999]. In dieser Arbeit liegt der Anteil spinaler Kavernome bei drei von 56 Patienten (5,4%), was einen von Hahn dokumentierten Anteil an spinalen Läsionen von 5,5% in einer Serie von 1361 Fällen ziemlich genau entspricht [Hahn 1999]. Es muss allerdings einschränkend bemerkt werden, dass sich aus einem Studiumumfang von 56 adulten Patienten eine zu geringe Fallzahl darstellt, um representative Aussagen zur Lokalisationsverteilung zu treffen. Des weiteren handelt es sich bei dem eingeschlossenen Patientengut wie bereits diskutiert um keinen repräsentativen Querschnitt aller Kavernomerkranken.

Eine übliche Einteilung unterscheidet supratentoriell und infratentoriell gelegene Läsionen, wobei sich der größte Anteil cerebraler Kavernome supratentoriell befindet [Bertalanffy et al. 1991, Bertalanffy et al. 1992, Hahn 1999, Maraire u. Awad 1995, Rosahl et al. 1998, Vaquero et al. 1987, Voigt u. Yasargil 1976]. Hsu et al. beziffern den Anteil infratentorieller Kavernome mit 26% [Hsu et al. 1993]. Die Prädilektionsstellen infratentorieller Kavernome sind laut Bertalanffy et al. Pons (26%), Cerebellum (17%), Mittelhirn (12%) und Medulla (8%) [Bertalanffy et al. 2002]. In dieser Studie wird eine etwas andere Einteilung, die besser mit der Prognose und der Klinik korreliert, vorgenommen. Die Läsionen werden in oberflächliche und tiefe Läsionen unterteilt. Dabei werden neben den infratentoriellen Kavernomen auch Kavernome in den Lokalisationen Basalganglien, Thalamus und Insel zu den tiefen Läsionen gezählt. Die Kavernomlokalisierung ist von prognostischer Bedeutung. Tiefe Läsionen haben eine schlechtere Prognose, da die funktionellen Bahnen in den tiefen Regionen enger gebündelt verlaufen, und dadurch auch kleinste Veränderungen schwerwiegende Folgen haben [Porter et al. 1997]. Der Anteil tiefer Läsionen dieser Untersuchung liegt mit 48,2% überdurchschnittlich hoch, was sich dadurch erklärt, dass es in den Kliniken, aus denen die Operationspräparate stammen, eine Spezialisierung auf diese Fälle gibt, und dass die Operationsindikation aufgrund der schlechten Prognose tief gelegener Kavernome bei entsprechender technischer und patientenbedingter Operabilität großzügig gestellt wird. Es handelt sich in der vorliegenden Arbeit um 17 infratentoriell lokalisierte Läsionen und 10 weitere tiefe Läsionen anderer Lokalisation. Innerhalb der 17 infratentoriellen Läsionen entsprechen die Anteile in Pons (23,5%), Medulla oblongata (11,8%) und Kleinhirn (17,6%) weitestgehend den oben genannten Prädilektionsstellen für infratentorielle Kavernome [Bertalanffy et al. 2002]. Der Anteil im Mittelhirn lokalisierter Läsionen liegt mit 8 von 17 (47%) jedoch deutlich über dem von Bertalanffy et al. berichteten Anteil von 12% [Bertalanffy et al. 2002], was ebenfalls mit der Spezialisierung der an dieser Studie beteiligten Zentren und der nicht repräsentativen Fallzahl zu erklären ist.

4.2 Experimentelle Aspekte

Als Erstes wird die Bedeutung der Expression der in der vorliegenden Arbeit nachgewiesenen Antigene in den untersuchten cerebralen Kavernomen besprochen. Die immunhistochemischen Befunde und ihre signifikanten Korrelationen werden daran anschließend, analog der Systematik des Ergebnisteils, in einem Unterkapitel Korrelationen diskutiert.

4.2.1 Untersuchte Antigene

4.2.1.1 Proliferations-assoziierte Antigene

Die proliferations-assoziierten Antigene konnten bei einem großen Anteil der untersuchten Präparate im Endothel nachgewiesen werden. Der Nachweis des im wesentlichen nukleär exprimierten PCNA [Hall et al. 1990, Hall u. Woods 1990, Jonsson et al. 1998, McCormick u. Hall 1992] konnte mit 87% aller Präparate deutlich häufiger geführt werden als der Nachweis von MIB-1 mit 43%. Eine erhöhte PCNA-Expressionsrate gegenüber MIB-1 ist auch in der Literatur dokumentiert [Cattoretti et al. 1992, Hall et al. 1990, Hall u. Woods 1990, Kubbutat et al. 1994a, Kubbutat et al. 1994b, Rose et al. 1994, Sawhney u. Hall 1992, Schlüter et al. 1993]. Die lange Halbwertszeit von PCNA von 20 Stunden führt dazu, dass das Antigen über die Aktivitätsphase hinaus detektierbar bleibt [Kubbutat et al. 1994a und b, McCormick u. Hall 1992]. Dahingegen ist die Expression von MIB-1 nur in den aktiven Phasen des Zellzykluses nicht jedoch in der G₀-Phase (Ruhephase) nachweisbar [Sasaki et al. 1987, Wersto et al. 1988], seine Halbwertszeit beträgt weniger als 1 Stunde [Kubbutat et al. 1994a und b]. Der Nachweis von PCNA und MIB-1 belegt, dass das Endothel cerebraler Kavernome proliferiert, im Gegensatz zu anderen physiologisch vorhandenen Endothelien des Gehirns, die diese Eigenschaft nicht besitzen. Damit ist das Wachstum der Gefäße von Kavernomen wie in der

Literatur beschrieben [Bertalanffy et al. 2002, Notelet et al. 1997b, Sure et al. 2001a] auch in der eigenen Studie nachgewiesen.

4.2.1.2 Angiogenese-assoziierte Antigene

Flk-1 (fetal liver kinase) wird bei physiologischen Prozessen der Endothelzellproliferation exprimiert und leitet als Rezeptor Signalprozesse in der Vaskularisation ein [Millauer et al. 1993]. In proliferierenden Endothelzellen des embryonalen und postnatalen Gehirns sind Flk-1 Transkripte reichlich vorhanden. Im Gegensatz dazu kommen sie in Gehirnen Erwachsener physiologischerweise nicht vor [Millauer et al. 1993]. Als hochaffiner VEGF-Rezeptor [Galland et al. 1993, Yancopoulos et al. 2000] nimmt Flk-1 zusammen mit VEGF eine zentrale Rolle in der Vaskulogenese bzw. Angiogenese ein. Der Nachweis von Flk-1 in fast 69% der Endothelien der untersuchten adulten und pädiatrischen Präparate belegt sowohl den embryonalen Charakter von Kavernomen als auch das Stattfinden von Angiogenese in diesen Läsionen.

Auch VEGF ist in 26% der Studienpräparate endothelial nachweisbar. VEGF (vascular endothelium growth factor) (Synonym: VPF [vascular permeability factor]) ist durch seine potente, selektive, mitogene Stimulation von Endothelzellen und die Erhöhung der Gefäßpermeabilität in die zellzyklus-induzierte Angiogenesekontrolle eingebunden [Brown et al. 1993, Conn et al. 1990, Connolly et al. 1989, Ferrara u. Henzel 1989, Keck et al. 1989, Leung et al. 1989]. In der Embryogenese wird es von ventrikulärem Neuroektoderm synthetisiert und fördert das Einwachsen von Kapillaren in das Gehirn vom perineuralen Gefäßplexus aus [Millauer et al. 1993]. Postnatal wird es in cerebralen Endothelzellen, wie in den durchgeführten Kontrollen, normalerweise nicht exprimiert. Tierexperimentell wurde bereits gezeigt, dass VEGF im adulten Gehirn eine erhebliche Neovaskularisation auslösen kann [Rosenstein et al. 1998]. Hochinteressant ist die vergleichsweise niedrige VEGF-Expressionsrate von 11,9% in den pädiatrischen Läsionen im Gegensatz

zu 36,2% in den adulten, die möglicherweise auf das Vorliegen unterschiedlicher Pathways in Genese und Wachstum adulter und pädiatrischer Kavernome hinweist. Auf diesen Sachverhalt wird im Folgenden im Unterkapitel Korrelationen noch detailliert eingegangen. Generell belegen die Expression von Flk-1 und VEGF, dass cerebrale Kavernome eine Fähigkeit zu Wachstum und Angiogenese innehaben.

HIF-1 α , der sogenannte „hypoxia inducible factor“, ist zur Stimulation der VEGF-Expression und zur Einleitung von Neovaskularisation befähigt, wie tierexperimentell in Ischämieversuchen bereits nachgewiesen wurde [Jin et al. 2000, Marti et al. 2000]. Es ist dokumentiert, dass Hypoxie VEGF-Synthese induzieren und dadurch indirekt Angiogenese stimulieren kann [Plate et al. 1992, Plate 1999, Shweiki et al. 1992]. HIF-1 α gehört somit zu den sekundär auf die Angiogenese einflussnehmenden Faktoren. Es handelt sich um einen heterodimeren Transkriptionsfaktor, dessen Untereinheit 1 α sich spezifisch an HIF bindet, das eine essentielle Rolle in der Sauerstoff-Homöostase spielt. Die Expression von HIF-1 α findet bei sinkender intrazellulärer Sauerstoffkonzentration statt und dient der Aktivierung einer Vielzahl von Genen, deren Genprodukte die intrazelluläre Sauerstoffverfügbarkeit positiv beeinflussen [Semenza 1998]. Zu diesen Proteinen zählt u.a. auch VEGF [Jin et al. 2000, Marti et al. 2000]. HIF-1 α ist im Endothel von 53,6% der untersuchten Präparate nachweisbar, was darauf hinweist, dass dem Vorhandensein von lokaler Hypoxie als Stimulus eine Bedeutung bei der Entstehung und dem Wachstum (durch Neoangiogenese bedingt) von cerebralen Kavernomen zuzukommen scheint.

Auch die endotheliale Expression von Endoglin in einem Anteil von 69,7% aller untersuchten Präparate belegt, dass es eine Dynamik in der Biologie cerebraler Kavernome gibt. Endoglin wird als proliferations-assoziiertes endotheliales Marker [Bredow et al. 2000] für die extraembryonale Angiogenese benötigt [Bredow et al. 2000]. Ihm kommt eine aktive Rolle bei der Gefäßneubildung unter erhöhtem Scherstress und/oder erhöhtem Blutfluss zu [Matsubara et al. 2000]. Des Weiteren werden eine Bedeutung für die Flk-1-Synthese [Cho et al.

2001] sowie eine Interaktion mit Sexualhormonen [Evangelou et al. 2000] postuliert. Die signifikant unterschiedliche endotheliale Expressionsrate von 61,4% in adulten im Vergleich zu 81% in pädiatrischen Läsionen ist in diesem Zusammenhang besonders interessant, weil sie darauf hinweisen könnte, dass adulte und pädiatrische Kavernome unterschiedlich biologisch aktiv sind und unterschiedliche Wachstumsmechanismen aufweisen. Eine detaillierte Gegenüberstellung adulter und pädiatrischer Läsionen hinsichtlich ihrer unterschiedlichen Expressionsmuster der untersuchten Antikörper sowie die Diskussion der in den unterschiedlichen Patientensubgruppen erhobenen Befunde schließt sich im Unterkapitel Korrelationen an.

Tie-2 und ebenso Tie-1 sind von Endothelzellen exprimierte Tyrosinkinasen [Uranishi et al. 2001]. Mitsamt seinen Liganden Angiopoietin-1 und -2, spielt Tie-2 (Synonym: Tek) eine kritische Rolle in der Gefäßentwicklung und beim Gefäßerhalt. Das Vorliegen minderwertiger endothelialer Supportstrukturen in AVMen könnte laut Hashimoto et al. durch eine verminderte Tie-2 Expression erklärbar sein [Hashimoto et al. 2000]. Der gleiche Sachverhalt sollte in der vorliegenden Studie für Kavernome erforscht werden. Aufgrund der entgegen den Erwartungen fast durchweg negativen Kontrollen aus normalem Hirngewebe, können aus den vorliegenden Ergebnissen für Tie-2 keine Aussagen über eine möglicherweise vorhandene Downregulation von Tie-2 in cerebralen Kavernomen getroffen werden. Eine mögliche Erklärung für die Negativität von cerebralen Kontroll- und Studienpräparaten könnte darin liegen, dass das Versuchsprotokoll an Präparaten humaner Plazenta, die auch als Positiv-Kontrolle dient, etabliert wurde. Angiogenese findet in humaner Plazenta möglicherweise in einem so viel ausgeprägteren Maße statt als in jeglichem normalen oder erkrankten Hirngewebe, dass dadurch potentiell nachzuweisendes Antigen in cerebralem Gewebe unter die Nachweisgrenze für das an der Plazenta etablierte Versuchsprotokoll fällt. In einer zukünftigen Studie sollte das Versuchsprotokoll für Tie-2 an einem anderen möglichst cerebralen Präparat etabliert werden, um verwertbare Aussagen über eine mögliche Downregulation dieses Angiopoietin-Rezeptors in cerebralen Kavernomen treffen zu können.

4.2.1.3 Zellkontakt-assoziiertes Antigen

CD 31 ist auf den Oberflächen von Thrombozyten, einigen weißen Blutzellen und Endothelzellen zu finden. Es ist ein Zell-zu-Zell Adhäsions Glykoprotein aus der Immunglobulin Superfamilie [Uranishi et al. 2001]. Uranishi et al. setzten CD 31 neben dem von Willebrand Faktor (vWF) als endothelialen Marker ein. Obgleich es sich bei beiden Proteinen um bekannte Endothelzellmarker handelt, waren die Endothelien vieler Kavernome CD 31 negativ, während sie eine deutliche vWF-Positivität zeigten. Laut Uranishi et al. könnte die selektive Down-Regulation der CD 31 Expression eine Rolle in der Pathogenese von Kavernomen spielen. [Uranishi et al. 2001]. Der dargestellte Sachverhalt sollte an den Präparaten der eigenen Studie nachvollzogen werden. Aufgrund der Negativität der cerebralen Kontrollpräparate für diesen endothelialen Marker lassen sich aus den vorliegenden Ergebnissen für CD 31 keine Schlussfolgerungen ziehen. Auch hier könnte es sich um ein Nachweisgrenzenproblem handeln, da das Versuchsprotokoll für den CD 31-Antikörper nicht an normalem Hirngewebe, sondern an einer cerebralen arteriovenösen Malformation etabliert wurde, die ein erheblich höheres Maß an endothelialelem Gewebe enthält als Anteile gesunden Hirns. Durch erneute Etablierung des CD-31 Versuchsprotokolls möglichst an nicht erkranktem cerebralem Gewebe könnte auch hier, eine eventuell vorliegende Downregulation des Antikörpers immunhistochemisch nachgewiesen werden.

4.2.2 Korrelationen

Die im Ergebnisteil vorgestellten Korrelationen werden im Folgenden diskutiert und in die Literatur eingeordnet. Ein Schwerpunkt liegt auf den Korrelationen zwischen Klinik und immunhistochemischen Ergebnissen innerhalb des adulten Patientenguts der Studie. Der zweite Hauptaspekt ist der Vergleich adulter und pädiatrischer Läsionen hinsichtlich ihrer immunhistochemischen Ergebnisse und deren Bedeutung.

4.2.2.1 Männliche vs. weibliche Patienten

Robinson et al. berichten, dass bei ihrer Untersuchung 86% der Blutungen bei Frauen auftraten mit einer besonderen Häufung im ersten Trimenon der Schwangerschaft [Robinson et al. 1993]. Das wirft die Frage auf, ob es geschlechtsspezifische endokrine Faktoren gibt, welche die Blutungsneigung beeinflussen. Das Auffinden von Östrogenrezeptoren in einigen Kavernomen weiblicher Patienten unterstützt die Annahme eines Hormoneinflusses auf die Blutungsneigung [Porter et al. 1999]. Um diesen in der Literatur beschriebenen hormonellen Einfluss zu überprüfen und mögliche weitere geschlechtsspezifische Unterschiede in den Läsionen männlicher und weiblicher Patienten aufzudecken, wurden die immunhistochemischen Ergebnisse aller männlichen Patienten erstens denen aller weiblichen Patienten gegenübergestellt und in einem zweiten Schritt mit den Ergebnissen der weiblichen Patienten der Altersgruppe 14 - 40 Jahre verglichen, in der von einer ausgeprägten Sekretion weiblicher Geschlechtshormone auszugehen ist. Sowohl bei dem weiblichen Gesamtkollektiv als auch in der o.g. Untergruppe weiblicher Patienten mit postulierter ausgeprägter Geschlechtshormonsekretion zeigen sich, verglichen mit dem männlichen Gesamtkollektiv der Studie, ähnliche prozentuale IHC-Ergebnisse mit teilweise geringen Abweichungen, die sicher nicht statistisch signifikant sind. Die von Robinson et al. aufgestellte These eines endokrinen Einflusses auf cerebrale Kavernome weiblicher Patienten [Robinson et al. 1993] lässt sich zwar durch die dargestellten Ergebnisse nicht widerlegen, kann aber nach Datenlage der vorliegenden Studie keinesfalls bestätigt werden.

4.2.2.2 Klinik adulter vs. IHC adulter Patienten

Die Korrelationen der klinischen Patientendaten mit den immunhistochemischen Ergebnissen bezieht sich aus bereits dargelegten Gründen ausschließlich auf das adulte Patientengut der Studie. In drei Unterkapiteln werden die

signifikanten Korrelationen bezüglich der Krampfanamnese, der Lokalisation und stattgehabter Blutungen vorgestellt und besprochen.

4.2.2.2.1 Krampfanamnese

Die endotheliale VEGF-Expression lag bei Patienten mit einem Krampfereignis in der Anamnese signifikant höher als bei Patienten mit leerer Krampfanamnese. Sie betrug 58,8% bei Patienten mit positiver Krampfanamnese gegenüber 26,8% bei denen ohne Krampfereignis mit einem p-Wert von $p=0,0282$. Für die subendotheliale Endoglinexpression ergab sich eine weitere statistisch relevante Korrelation. Eine mit 82,4% deutlich höhere Expression konnte bei Patienten mit positiver Krampfanamnese festgestellt werden, gegenüber 50% bei Patienten mit negativer Krampfanamnese. Der zugehörige p-Wert liegt bei $p=0,0267$. Für beide Antigene konnte auch in allen anderen untersuchten Gefäßschichten eine deutlich höhere, jedoch statistisch nicht relevante, Antigenexpression bei Patienten mit zurückliegendem Krampfereignis detektiert werden als bei Patienten mit leerer Krampfanamnese. Es ist also möglich, dass Konvulsionen die biologische Aktivität von Kavernomen dahingehend beeinflussen, dass es zu einer Hochregulation der Expression von VEGF und Endoglin in den Läsionen kommt. Dieses könnte für VEGF möglicherweise durch konvulsionsbedingte Hypoxie im Gewebe verursacht sein. Es ist dokumentiert, dass Hypoxie VEGF-Synthese induzieren und dadurch indirekt Angiogenese stimulieren kann [Plate et al. 1992, Plate 1999, Shweiki et al. 1992]. Endoglin [Matsubara et al. 2000] und ebenso VEGF [Malek et al. 2000] kommt eine aktive Rolle bei der Gefäßneubildung unter erhöhtem Scherstress und/oder Blutfluss zu. Auch diese Phänomene könnten konvulsionsbedingt auftreten und dadurch zu einer erhöhten Antigenexpression führen. In cerebralen Kavernomen von Patienten, die mindestens einen Krampfanfall erlitten haben, scheint Angiogenese in einem größeren Ausmaß stattzufinden als in den Läsionen von Patienten ohne Krampfanfälle in der Anamnese.

4.2.2.2.2 Lokalisation

Von der eigenen Arbeitsgruppe ist bereits anhand des VEGF Antigens dokumentiert, dass Angiogenese in superfiziellen Kavernomen eine größere Rolle spielt als in tiefen Läsionen [Sure et al. 2005]. In der vorliegenden Studie wurden ebenfalls oberflächlich gelegene Läsionen tiefen gegenübergestellt, und darüber hinaus wurden die oberflächlichen Kavernome mit den im Hirnstamm gelegenen verglichen.

Beim Vergleich oberflächlicher und tiefer Kavernome konnte eine signifikant höhere VEGF-Expression im Endothel bei Patienten mit oberflächlichen Läsionen von 60% gegenüber 17,9 % bei Patienten mit tiefen Kavernomen mit einem Signifikanzniveau von $p=0,0042$ festgestellt werden. Des Weiteren betrug die subendotheliale Endoglinexpression bei oberflächlichen Läsionen 80% verglichen mit 48,1% bei tiefen Kavernomen und einem p-Wert von $p=0,0204$.

Stellt man den oberflächlichen Läsionen ausschließlich Hirnstammkavernome gegenüber, so erhält man Ergebnisse, die die oben aufgeführten Resultate bestätigen, darüber hinaus jedoch eine wesentlich höhere statistische Signifikanz mit deutlich niedrigeren p-Werten aufweisen: Die VEGF-Expression ist in allen drei untersuchten Schichten bei den oberflächlichen gegenüber den Hirnstammkavernomen in statistisch signifikantem Maße erhöht. Im Einzelnen lauten Zahlen für VEGF endothelial 60% vs. 7,1% mit $p=0,0034$, subendothelial 48% vs. 14,3% mit $p=0,0469$ und perivascular 56% vs. 14,3% mit $p=0,0151$.

Die subendotheliale Endoglinexpression ist mit 80% in oberflächlichen Läsionen gegenüber 38,5% in Kavernomen des Hirnstamms mit einem p-Wert von $p=0,0143$ ebenfalls signifikant erhöht.

Neben der bereits dokumentierten höheren VEGF-Expression in oberflächlichen Läsionen gegenüber tiefen [Sure et al. 2005] konnte eine ebenfalls erhöhte Endoglinexpression in superfiziell gelegenen Läsionen nachgewiesen werden. Eine Hochregulation unter erhöhtem Scherstress ist in der Literatur sowohl für VEGF [Malek et al. 2000] als auch für Endoglin [Matsubara et al. 2000] beschrieben. Geht man jedoch davon aus, dass hohe Durchflussraten und

Scherstress in Kavernomen nicht vorkommen, so müsste die Hochregulation der gefundenen Antikörper hier durch andere Pathomechanismen erfolgen. Möglich wäre aber auch, dass in superfiziellen Kavernomen im Vergleich zu tiefen Läsionen ein relativ erhöhter Scherstress und relativ höhere Durchflussraten vorliegen, die zu erhöhten VEGF- und Endoglin-Expressionsraten führen.

Diese Ergebnisse zeigen, dass Angiogenese in superfiziellen Kavernomen in signifikant höherem Ausmaß stattfindet als in tiefen und insbesondere als in Hirnstammkavernomen, wobei den Antigenen VEGF und Endoglin eine entscheidende Rolle in dem zugrunde liegenden Pathomechanismus zuzukommen scheint.

4.2.2.2.3 Blutungen / LCMOH

Fragestellung der Untersuchung war, ob zu unterschiedlichen Zeitpunkten stattgefunden klinisch manifeste Blutungen der untersuchten Läsionen einen Einfluss auf die Antigenexpression in diesen haben. Es wurden Patienten mit einem Blutungsereignis in der Anamnese, das 6 Monate oder länger vor dem Operationszeitpunkt zurückliegt (>6 Mon.), den Ergebnissen von Patienten gegenübergestellt mit einer Blutung, die 2 Monate oder weniger vor der Operation stattgefunden hat (<2 Mon.).

VEGF wird zwar in allen drei untersuchten Gewebsschichten bei den Patienten mit einer 6 Monate oder länger zurückliegenden Blutung (>6 Mon.) häufiger exprimiert als bei Patienten mit einer 2 Monate oder kürzer vor der Operation zurückliegenden Blutung (<2 Mon.), jedoch sind nur die Werte für die VEGF-Expression im perivaskulären Gewebe mit 64,3% gegenüber 18,8% und einem p-Wert von $p=0,0175$ statistisch signifikant.

Auch die perivaskuläre Endoglin-Expression in der Gruppe >6 Mon. mit 78,6% ist gegenüber dem Ergebnis von 33,3% in der Gruppe <2 Mon. signifikant erhöht. Der p-Wert dieser Korrelation beträgt $p=0,0184$.

Es finden sich also erhöhte Expressionsraten angiogenese-assoziiierter Antikörper in den Läsionen der Gruppe >6 Mon. gegenüber denen <2 Mon.. Da

die vorliegende Untersuchung nicht quantitativ ausgewertet wurde, gibt es zwei mögliche Schlüsse: Entweder führt die zunehmende über Monate stattfindende Organisation eines Hämatoms nach einer Blutung zu einer Heraufregulation von VEGF und Endoglin. So würde also nach einer Kavernomblutung durch deren Organisation neue Angiogenese induziert. Dieser Sachverhalt könnte ebenfalls erklären, dass bereits geblutete Läsionen ein erhöhtes Blutungsrisiko gegenüber zuvor nicht gebluteten aufweisen [Alexander et al. 1998, Kondziolka et al. 1995]. Eine zweite (weniger wahrscheinliche) Erklärung ist, dass durch die Kavernomblutung für eine gewisse Zeit eine Downregulation der vorgenannten Antikörper stattfindet, bevor sie z.B. nach 6 Monaten wieder im ursprünglichen Ausmaß in diesen Läsionen exprimiert werden.

Die vorliegenden Daten belegen, dass Angiogenese in Läsionen nach einer Blutung >6 Mon. eine relativ größere Rolle spielt als in Läsionen nach Blutungsereignissen <2 Mon..

4.2.2.3 Pädiatrische vs. adulte Kavernome

Pädiatrische Kavernome unterscheiden sich klinisch erheblich von den Läsionen adulter Patienten. Der Kavernomdurchmesser ist bei Kindern mit durchschnittlich 6,7 cm größer als bei Erwachsenen mit durchschnittlich 2-3 cm [Mottolese et al. 2001]. Pädiatrische Kavernompatienten weisen ebenfalls eine hohe Variabilität der gleichen Symptome wie adulte Patienten auf. Im Unterschied zu adulten Kavernomen liegt die Blutungsinzidenz bei pädiatrischen Läsionen, die auf 36 – 78% der symptomatischen Fälle geschätzt wird, jedoch deutlich höher [Mottolese et al. 2001]. Es stellt sich die Frage, ob es neben den klinischen Unterschieden auch entsprechende Unterschiede in der biologischen Aktivität der Läsionen beider Patientengruppen gibt. Um dieser Frage nachzugehen, wurden zunächst die Ergebnisse aller pädiatrischen Patienten den Ergebnissen aller adulten Patienten der Studie gegenübergestellt. In einem nächsten Schritt wurde eine weitere Differenzierung in die Altersgruppen junge pädiatrische Patienten (0-5 Jahre) und ältere adulte Patienten (>55 Jahre) vorgenommen und diese miteinander

verglichen, um so mögliche Unterschiede in diesen extrem weit auseinanderliegenden Altersgruppen zu finden. Im Folgenden werden die gefundenen statistisch signifikanten Unterschiede der Antigenexpression zwischen pädiatrischen und adulten Kavernomen und den oben vorgestellten Subgruppen vorgestellt und diskutiert.

4.2.2.3.1 Pädiatrische gesamt vs. adulte gesamt

Die endotheliale Flk-1-Expression lag mit 69% in der pädiatrischen Gruppe und 68,4% in der adulten Patientengruppe annähernd gleich hoch. Auffällig war jedoch eine bei den pädiatrischen Patienten signifikant niedrigere Flk-1-Expression im perivaskulären Gewebe von 9,5% gegenüber 31,6% bei den adulten Patienten. Der zugehörige p-Wert beträgt $p=0,0229$. Die biologische Aktivität ist also, gemessen am Flk-1 Antigen, in adulten und pädiatrischen Läsionen im Endothel gleichermaßen heraufreguliert, jedoch scheint die Umgebungsaktivität im perivaskulären Gewebe in adulten Kavernomen signifikant stärker ausgeprägt als in kindlichen Läsionen. Flk-1 ist ein hochaffiner VEGF-Rezeptor [Galland et al. 1993, Yancopoulos et al. 2000], der zusammen mit VEGF eine Schlüsselrolle in der Angio- bzw. Vasculogenese einnimmt. Das VEGF-Antigen konnte im adulten Patientenkollektiv in allen untersuchten Gewebeschichten signifikant häufiger nachgewiesen werden als im pädiatrischen. Endothelial sind 36,2% der adulten gegenüber 11,9% der pädiatrischen Patienten VEGF-positiv mit einem p-Wert von $p=0,0146$, subendothelial beträgt dieses Verhältnis 32,8% zu 4,8% mit einem p-Wert von $p=0,0039$, und perivaskulär war eine Positivität von 39,7% zu 2,4% und $p=0,0020$ zu verzeichnen. Daraus ist abzuleiten, dass ein VEGF-assoziiierter Pathway in der Angiogenese cerebraler Kavernome bei adulten Patienten von erheblich größerer Bedeutung zu sein scheint als bei pädiatrischen. Entsprechende Daten aus der eigenen Arbeitsgruppe sind bereits publiziert [Tirakotai et al. 2006].

Für Endoglin konnten bei den pädiatrischen Patienten erheblich höhere Expressionsraten als im adulten Patientenkollektiv nachgewiesen werden. Endoglin war in 81% der pädiatrischen Fälle in allen drei untersuchten

Gewebeschichten anfärbbar. Bei den adulten Patienten war der Anteil der Endoglin-Expression mit 61,4% im Endothel, 59,6% im Subendothel und 54,4% im perivaskulären Gewebe deutlich niedriger. Mit p-Werten von $p=0,0382$, respektive $p=0,0107$ sind die subendothelialen und perivaskulären Differenzen statistisch signifikant. Endoglin scheint also für die biologische Aktivität pädiatrischer Läsionen von wesentlich größerer Bedeutung zu sein als bei adulten Kavernomen. Histologisch ähneln Kavernome Teleangiektasien [McCormick 1966, Rigamonti et al. 1988, Rigamonti et al. 1991]. Eine Mutation des Endoglin-Gens liegt der hereditären hämorrhagischen Teleangiektasie (HHT) (Morbus Rendu-Osler-Weber) zugrunde [Abdalla et al. 2000, Berg et al. 1997, Bourdeau et al. 2000, Cheifetz et al. 1992, Chen et al. 2001, Matsubara et al. 2000]. Möglicherweise haben pädiatrische Kavernome eine den Teleangiektasien ähnliche Genese. Die vorgestellten Korrelationen legen nahe, dass in der biologischen Aktivität pädiatrischer Kavernome, im Gegensatz zu adulten, ein Endoglin-assoziiierter Pathway von größerer Bedeutung ist. Als proliferations-assoziiierter endothelialer Marker [Bredow et al. 2000], der für die extraembryonale Angiogenese nötig ist [Artur et al. 2000], wird Endoglin eine aktive Rolle bei der Gefäßneubildung unter erhöhtem Scherstress und/oder erhöhtem Blutfluss zugeschrieben [Matsubara et al. 2000]. Obwohl Kavernome keine Läsionen mit hohen Blutflussraten darstellen, ist es trotzdem möglich, dass die Flussraten in den Gefäßen pädiatrischer Läsionen relativ höher sind als in adulten Läsionen, was erstens zu höherer Endoglinexpression führt und zweitens eine mögliche Erklärung für die höhere Blutungsinzidenz pädiatrischer Kavernome darstellt.

Die gezeigten unterschiedlichen Aktivitätsausprägungen von VEGF und Endoglin und die daraus resultierenden möglicherweise unterschiedlichen Pathways für die Genese und das Wachstum adulter und pädiatrischer Läsionen könnten eine Erklärung für das unterschiedliche klinische Erscheinungsbild sein mit größerer Wachstumstendenz und höherer Blutungsinzidenz von pädiatrischen gegenüber adulten Kavernomen [Mottolese et al. 2001].

4.2.2.3.2 Pädiatrische (0-5 Jahre) vs. adulte (>55 Jahre)

Der Vergleich dieser beiden Patientensubgruppen hat im Wesentlichen die Ergebnisse der vorangehenden Gegenüberstellung der gesamten pädiatrischen mit den gesamten adulten Patienten bestätigt. Als besonders interessant sind hier die Ergebnisse zur VEGF-Expression hervorzuheben. Sie scheint mit zunehmendem Lebensalter anzusteigen. Im adulten Gesamtkollektiv liegen die VEGF-Expressionsraten in den verschiedenen Gewebeschichten zwischen 30 und 40%, bei den Patienten >55 Jahre werden Expressionsraten zwischen 55 und 80% gefunden. Vergleicht man diese Werte der Altersgruppe >55 Jahre mit der VEGF-Positivität von 5,6% der pädiatrischen Subgruppe <5 Jahre in allen Gewebeschichten, so ist der festgestellte Unterschied für alle 3 Gefäßwandschichten statistisch signifikant. Dieser Befund untermauert die These, dass Kavernome von Patienten verschiedener Altersgruppen unterschiedliche biologische Aktivität innehaben, und dass VEGF in der adulten Patientengruppe eine größere Bedeutung zukommt als in pädiatrischen Läsionen.

4.3 Schlussfolgerungen

Die wichtigsten aus der vorliegenden Arbeit abzuleitenden Schlussfolgerungen werden hier noch einmal kurz dargestellt:

1. Bei cerebralen Kavernomen handelt es sich eher um dynamische als wie vormals vermutet um statische Läsionen. Es finden Proliferation (PCNA und MIB-1) und Angiogenese (Flk-1 und VEGF) in diesen Läsionen statt.
2. Geschlechtsspezifische Unterschiede in der Antigenexpression, welche die These eines möglichen Hormoneinflusses untermauern könnten, konnten in der vorliegenden Studie nicht nachgewiesen werden.
3. Die Hochregulation der Expressionsraten für VEGF und Endoglin bei Patienten mit mindestens einem Krampfanfall in der Anamnese könnte darauf hinweisen, dass in den Läsionen dieser Patientengruppe Angiogenese in erhöhtem Ausmaß stattfindet.

4. Auch in superfiziellen Läsionen scheint gegenüber tiefen Läsionen und insbesondere Hirnstammkavernomen Angiogenese in höherem Ausmaß stattzufinden, da hier ebenfalls eine Heraufregulation der Antigenexpression für VEGF und Endoglin nachweisbar ist.
5. Durch stattgehabte Blutungen wird möglicherweise neue Angiogenese in Kavernomen induziert. Erhöhte VEGF- und Endoglin-Positivität in Läsionen von Patienten deren letztes Blutungsereignis >6 Monate zurückliegt gegenüber Patienten mit einer Blutung <2 Monate vor der Operation weisen auf erhöhte Angiogenese in Läsionen mit länger zurückliegenden (>6 Mon.) Blutungen hin.
6. Pädiatrische Kavernome scheinen sich in ihrer biologischen Aktivität von adulten Läsionen zu unterscheiden: Bei adulten Patienten spielt vermutlich ein VEGF-assoziiierter Pathway eine signifikant größere Rolle als bei pädiatrischen Patienten, während im pädiatrischen Patientengut einem Endoglin assoziierten Pathway eine vergleichsweise wesentlich höhere Bedeutung zuzukommen scheint.

4.4 Ausblick

Die vorliegende Arbeit legt nahe, dass den Antigenen VEGF und Endoglin Schlüsselrollen in der biologischen Aktivität von Kavernomen verschiedener Patientengruppen bezüglich Klinik und Alter zukommen. Mögliche VEGF- und Endoglin-assoziierte Pathways sollten auf molekularer Ebene erforscht und besser verstanden werden. Darüber hinaus könnten weitere Angiogenese-assoziierte Antikörper wie z.B. Angiopoietin auf zellulärer und molekularer Ebene zum besseren Verständnis der Pathomechanismen dieser Erkrankung führen.

Um den Vergleich adulter und pädiatrischer Kavernome fortzuführen, sollten auch die klinischen Daten der pädiatrischen Patienten, die zur Auswertung dieser Studie nicht zur Verfügung standen, mit den immunhistochemischen Ergebnissen korreliert und den Resultaten der adulten Patienten gegenübergestellt werden.

Des Weiteren könnte die Untersuchung spezieller Patientengruppen, insbesondere von Patienten mit multiplen und/oder familiär gehäuften Kavernomerkrankungen, zum besseren Verständnis der biologischen Mechanismen der Erkrankung beitragen.

Aus dem besseren Verständnis der Pathomechanismen, die der Genese und dem Wachstum von Kavernomen verschiedener Patientengruppen mit unterschiedlicher Klinik und unterschiedlichen Alters zugrundeliegen, ließen sich möglicherweise neue für die jeweiligen Patientengruppen individuelle therapeutische Optionen entwickeln: Es könnten Stoffe zur Anwendung gebracht werden, die beispielsweise blockierend in die zugrundeliegenden Proliferations- und/oder Angiogenese-Pathways eingreifen, um so das Wachstum bestehender Läsionen zu inhibieren oder Rezidive operierter Kavernome zu verhindern.

5 Zusammenfassung

Die vorliegende immunhistochemische Studie cerebraler Kavernome soll zur Klärung der Pathomechanismen dieser in allen Altersgruppen vorkommenden Gefäßmalformation beitragen. Schwerpunkte der Arbeit liegen, nach der Vorstellung der Ergebnisse bezogen auf die gesamte Studie, in der Korrelation der immunhistochemischen Ergebnisse mit klinischen Parametern innerhalb der adulten Patientengruppe und dem Vergleich der immunhistochemischen Ergebnisse von pädiatrischen und adulten Patienten. Es wird der Frage nachgegangen, ob verschiedene klinische Parameter und unterschiedliche Altersgruppen mit Unterschieden in der biologischen Aktivität der vorliegenden Läsionen einhergehen. Der Umfang der Studie beläuft sich auf insgesamt 87 Patienten, darunter 56 adulte und 31 pädiatrische. Mittels immunhistochemischer Technik werden Proliferations- und Angiogenese-assoziierte Antigene in Paraffinschnitten der Operationspräparate nachgewiesen.

Durch den Nachweis von PCNA- und MIB-1-Antigen im Endothel von 87% respektive 43% aller Studienpräparate, konnte belegt werden, dass Proliferation in cerebralen Kavernomen stattfindet. Angiogenese konnte anhand der Antikörper Flk-1 (endothelial in 69% der Gesamtstudie) und VEGF (endothelial in 26% der Gesamtstudie) nachgewiesen werden. Die Detektion des sogenannten „hypoxia inducible factor“ HIF-1 α , der unter Hypoxie heraufreguliert wird, im Endothel von 53,6% der untersuchten Präparate, weist darauf hin, dass das Vorhandensein lokaler Hypoxie als Stimulus für Wachstum und Genese von Kavernomen möglicherweise von Bedeutung ist. Eine endotheliale Endoglinexpression in einem Anteil von 69,7% aller Präparate stellt einen weiteren Beweis für die Dynamik der Biologie cerebraler Kavernome, insbesondere beim Vergleich der Expressionsraten verschiedener Patientengruppen, dar.

Geschlechtsspezifische Unterschiede in der Antigenexpression, welche die These eines möglichen Hormoneinflusses bestärken könnten, wurden in der vorliegenden Arbeit nicht nachgewiesen.

Adulte Patienten mit einer positiven Krampfanamnese weisen signifikant höhere Expressionsraten für VEGF und Endoglin auf als adulte Patienten mit leerer

Krampfanamnese. Das könnte ein Indiz dafür sein, dass in den Läsionen dieser Patientengruppe Angiogenese in erhöhtem Ausmaß stattfindet.

Ebenfalls signifikant höhere Expressionsraten für VEGF und Endoglin sind in superfiziellen gegenüber tief lokalisierten Kavernomen innerhalb der adulten Patientengruppe zu finden. Auch in superfiziellen Läsionen scheint Angiogenese eine vergleichsweise höhere Bedeutung zuzukommen als in tiefen.

Korreliert man die Ergebnisse von adulten Patienten mit einem Blutungsereignis, das >6 Monate vor dem Operationszeitpunkt zurückliegt, mit den Ergebnissen von adulten Patienten mit einer Blutung <2 Monate vor der Operation, so findet sich auch hier eine signifikant höhere VEGF- und Endoglin-Positivität in der Patientengruppe >6 Monate. Das könnte ein Hinweis darauf sein, dass mit zunehmender Hämatomorganisation einige Zeit nach einer Blutung neue Angiogenese induziert wird, die dann wiederum zu einem erhöhten Blutungsrisiko führen könnte, wie es für geblutete Kavernome in der Literatur berichtet wird.

Pädiatrische Kavernome scheinen sich in ihrer biologischen Aktivität von adulten zu unterscheiden. Das VEGF-Antigen ist bei adulten Patienten signifikant häufiger detektierbar als bei pädiatrischen, während in der pädiatrischen Subgruppe Endoglin signifikant häufiger nachzuweisen ist. Daraus kann man ableiten, dass für die Kavernomerkrankungen von pädiatrischen und adulten Patienten möglicherweise unterschiedliche Pathways eine Rolle spielen. Bei adulten Patienten scheint VEGF eine Schlüsselrolle im zugrundeliegenden Pathomechanismus zuzukommen, während das bei pädiatrischen Patienten für Endoglin der Fall zu sein scheint.

Zusammenfassend lässt sich feststellen, dass den Antigenen VEGF und Endoglin besondere Bedeutung für mögliche unterschiedliche Pathomechanismen der Kavernomerkrankung sowohl bei Patienten verschiedenen Alters als auch bei Patienten mit unterschiedlicher Klinik zukommt. Die Bedeutung von VEGF und Endoglin für die biologische Aktivität cerebraler Kavernome sollte genauer untersucht werden. Aus dem besseren Verständnis möglicher unterschiedlicher Pathomechanismen der Erkrankung für verschiedene Patientengruppen könnten zukünftig individuelle Therapiekonzepte neben der operativen Therapie hervorgehen.

6 Literaturverzeichnis

1. Abdalla SA, Pece-Barbara N, Vera S, Tapia E, Paez E, Bernabeu C, Letarte M. Analysis of ALK-1 and endoglin in newborns from families with hereditary hemorrhagic telangiectasia type 2. *Hum Mol Genet* 9: 1227-1237, 2000
2. Abdulrauf SI, Awad IA. Comment on: Risks of surgical management for cavernous malformations of the nervous system. *Neurosurgery* 42: 1227, 1998
3. Alexander MJ, De Salles AA, Tomiyasu U. Multiple radiation-induced intracranial lesions after treatment for pituitary adenoma. Case Report. *J Neurosurg* 88: 111-115, 1998
4. Artur HM, Ure J, Smith AJ, Renforth G, Wilson DI, Torsney E, Charlton R, Parums DV, Jowett T, Marchuk DA, Burn J, Diamond AG. Endoglin, an ancillary TGFbeta receptor, is required for extraembryonic angiogenesis and plays a key role in heart development. *Dev Biol* 217: 42-53, 2000
5. Bakir A, Savas A, Yilmaz E, Savas B, Erden E, Caglar S, Sener O. Spinal intradural-intramedullary cavernous malformation. Case report and literature review. *Pediatr Neurosurg* 42: 35-37, 2006
6. Berg JN, Gallione CJ, Stenzel TT, Johnson DW, Allen WP, Schwartz CE, Jackson CE, Porteous ME, Marchuk DA. The activin receptor-like kinase 1 gene: genetic structure and mutations in hereditary hemorrhagic telangiectasia type 2. *Am J Hum Genet* 6: 60-67, 1997
7. Berkman RA, Merrill MJ, Reinhold WC, Monacci WT, Saxena A, Craig Clark W, Robertson JT, Oldfield EH. Expression of the vascular permeability factor/vascular endothelial growth factor gene in central nervous system neoplasms. *J Clin Invest* 91: 153-159, 1993
8. Bertalanffy H, Gilsbach JM, Eggert HR, Seeger W. Microsurgery of deep-seated cavernous angiomas: Report of 26 cases. *Acta Neurochir (Wien)* 108: 91-99, 1991
9. Bertalanffy H, Kühn G, Scheremet R, Seeger W. Indications for surgery and prognosis in patients with cerebral cavernous angiomas. *Neurol Med Chir (Tokyo)* 32: 659-66, 1992
10. Bertalanffy H, Sure U, Petermeyer M, Becker R, Gilsbach JM. Management of aneurysms of the vertebral artery-posterior inferior cerebellar artery complex. *Neurol Med Chir* 38: 93-103, 1998
11. Bertalanffy H, Benes L, Miyazawa T, Alberti O, Siegel AM, Sure U. Cerebral cavernomas in the adult. Review of the literature and analysis of 72 surgically treated patients. *Neurosurg Rev* 25: 1-53, 2002
12. Bicknell JM, Carlow TJ, Kornfeld M, Stovring M, Turner P. Familial cavernous angiomas. *Arch Neurol* 35: 746-749, 1978
13. Bobik A, Campbell JH. Vascular-derived growth factors: cell biology, pathophysiology, and pharmacology. *Pharmacol Rev* 45: 1-42, 1993
14. Bogren H, Svalander C, Wickbom I. Angiography in intracranial cavernous hemangiomas. *Acta Radiol* 10: 81-89, 1970
15. Bourdeau A, Cymerman U, Paquet ME, Meschino W, McKinnon WC, Guttmacher AE, Becker L, Letarte M. Endoglin expression is reduced in normal vessels but still detectable in arteriovenous malformations of patients with hereditary hemorrhagic telangiectasia type 1. *Am J Pathol* 156: 911-923, 2000

16. Bredow S, Lewin M, Hofmann B, Marecos E, Weissleder R. Imaging of tumour neovasculature by targeting the TGF-beta binding receptor endoglin. *Eur J Cancer* 36: 675-681, 2000
17. Breier G, Albrecht U, Sterrer S, Risau W. Expression of vascular endothelial growth factor during embryonic angiogenesis and endothelial cell differentiation. *Development* 114: 521-532, 1992
18. Brown LF, Berse B, Jackman RW, Tognazzi K, Manseau EJ, Dvorak HF, Senger DR. Increased expression of vascular permeability factor (VEGF) and its receptors in kidney and bladder carcinomas. *Am J Pathol* 143: 1255-1262, 1993
19. Butz N. Endotheliale Proliferation und Angiogenese cerebraler Gefäßfehlbildungen. Medizinische Dissertation, Marburg, 2002
20. Cantu C, Murillo-Bonilla L, Arauz A, Higuera J, Padilla J, Barinagarrementeria F. Predictive factors for intracerebral hemorrhage in patients with cavernous angiomas. *Neurol Res* 27: 314-318, 2005
21. Cattoretti G, Becker MHG, Key G, Duchrow M, Schlüter C, Galle J, Gerdes J. Monoclonal antibodies against recombinant parts of the Ki67 antigen (MIB 1 and MIB 3) detect proliferating cells in microwave-processed formalin-fixed paraffin sections. *Journal of Pathology* 168: 357-363, 1992
22. Cheifetz S, Bellon T, Cales C, Vera S, Bernabeu C, Massague J, Letarte M. Endoglin is a component of the transforming growth factor- β receptor system in human endothelial cells. *J Biol Chem* 267: 19027-19030, 1992
23. Chen H, Li D, Saldeen T, Mehta JL. Transforming growth factor-beta (1) modulates oxydatively modified LDL-induced expression of adhesion molecules: role of LOX-1. *Circ Res* 89: 1155-1160, 2001
24. Cho SK, Bourdeau A, Letarte M, Zuniga-Pflucker JC. Expression and function of CD105 during onset of hematopoiesis from Flk1(+) precursors. *Blood* 98: 3635-3642, 2001
25. Conn G, Bayne ML, Soderman DD, Kwok PW, Sullivan KA, Palisi TM, Hope DA, Thomas KA. Aminoacid and cDNA sequences of vascular endothelial cell mitogen that is homologous to platelet-derived growth factor. *Proc Natl Acad Sci USA* 87: 2628-2632, 1990
26. Connolly DT, Heuvelman DM, Nelson R, Olander JV, Eppley BL, Delfino JJ, Siegel NR, Leimgruber RM, Feder J. Tumor vascular permeability factor stimulates endothelial cell growth and angiogenesis. *J Clin Invest* 84: 1470-8, 1989
27. Cosgrove GR, Bertrand G, Fontaine S. Cavernous angiomas of the spinal cord. *J Neurosurg* 68: 31-36, 1988
28. Craig HD, Gunel M, Cepeda O, Johnson EW, Ptacek L, Steinberg GK, Ogilvy CS, Berg MJ, Crawford SC, Scott RM, Steichen-Gersdorf E, Sabroe R, Kennedy CTC, Mettler G, Beis MJ, Fryer A, Awad IA, Lifton RP. Multilocus linkage identifies two new loci for a Mendelian form of stroke, cerebral cavernous malformation, at 7q15-13 and 3q25.2-27. *Hum Mol Gen* 7: 1851-1858, 1998
29. Del Curling O, Kelly DL, Elster AD, Craven TE. An analysis of the natural history of cavernous angiomas. *J Neurosurg* 75: 702-708, 1991
30. Detwiler PW, Porter RW, Zabramski JM, Spetzler RF. De novo formation of a central nervous system cavernous malformation: implication for predicting risk of hemorrhage. *J Neurosurg* 87: 629-632, 1997

31. Detwiler PW, Porter RW, Zabramski JM, Spetzler RF. Radiation-induced cavernous malformation. *J Neurosurg Forum* 89: 167-168, 1998
32. De Vries C, Escobedo JA, Ueno H, Houck K, Ferrara N, Williams LT. The fms-like tyrosine kinase, a receptor for vascular endothelial growth factor. *Science* 255: 989-991, 1992
33. Di Rocco C, Iannelli A, Tamburrini G. Cavernomas of the central nervous system in children. A report of 22 cases. *Acta Neurochir (Wien)* 138: 1267-1274, 1996
34. Dubovsky J, Zabramski JM, Kurth J, Spetzler RF, Rich SS, Orr HT, Weber JL. A gene responsible for cavernous malformations of the brain maps to chromosome 7q. *Hum Mol Genet* 4: 453-458, 1995
35. Duhem R, Vinchon M, Leblond P, Soto-Ares G, Dhellemmes P. Cavernous malformations after cerebral irradiation during childhood: report of nine cases. *Childs Nerv Syst* 21: 922-925, 2005
36. Evangelou A, Jindal SK, Brown TJ, Letarte M. Down-regulation of transforming growth factor beta receptors by androgen in ovarian cancer cells. *Cancer Res* 60: 929-935, 2000
37. Fahlbusch R, Strauss C. Surgical significance of cavernous hemangioma of the brain stem. *Zentralbl Neurochir* 52(1):25-32, 1991
38. Fairman MP. DNA polymerase δ /PCNA: actions and interactions. *J Cell Sci* 95: 1-4, 1990
39. Fender LJ, Lenthall RK, Jaspan T. De novo development of presumed cavernomas following resolution of E. coli subdural empyemas. *Neuroradiol* 42: 778-780, 2000
40. Ferrara N, Henzel WJ. Pituitary follicular cells secrete a novel heparin-binding growth factor specific for vascular endothelial cells. *Biochem Biophys Res Comm* 161: 851-858, 1989
41. Ferrara N, Winer J, Burton T. Aortic smooth muscle cells express and secrete vascular endothelial growth factor. *Growth Factors* 5: 141-148, 1991
42. Fobe JL, De Uma JB, De Buone ML, Correa Neto J. Familial cavernous angioma. Report in 3 generations. *Arq Neuropsiquiatr* 54: 655-660, 1996
43. Fortuna A, Ferrante L, Mastronardi L, Aquì M, d'Addetta R. Cerebral cavernous angiomas in children. *Childs Nerv Syst* 5: 201-207, 1989
44. Fraser FC. Trinucleotide repeats not the only cause of anticipation. *Lancet* 350: 459-460, 1997
45. Fritschì JA, Reulen HJ, Spetzler RF, Zabramski JM. Cavernous malformations of the brainstem. A review of 139 cases. *Acta Neurochir* 130: 35-46, 1994
46. Fukui M, Matsushima T, Ikezaki K, Natori Y, Inamura T, Ohara S, Kawamura T. Surgery of angiomas in the brainstem with a stress on the presence of teleangiectasia. *Neurol Med Chir (Tokyo)* 38 Suppl: 250-254, 1998
47. Gaensler EHL, Dillon WP, Edwards MSB, Larson DA, Rosenau W, Wilson CB. Radiation-induced Telangiectasia in the Brain Simulates Cryptic Vascular Malformation at MR Imaging. *Radiology* 193: 629-636, 1994
48. Galland F, Karamysheva A, Pebusque MJ, Borg JP, Rottapel R, Dubreuil P, Rosnet O, Birnbaum D. The FLT4 gene encodes a transmembrane tyrosine kinase related to the vascular endothelial growth factor receptor. *Oncogene* 8: 1233-1240, 1993

49. Gerdes J. Ki-67 and other proliferation markers useful for immunohistological diagnostic and prognostic evaluations in human malignancies. *Cancer Biology* 1: 199-206, 1990
50. Gerdes J, Li Li, Schlüter C, Duchrow M, Wohlenberg C, Gerlach C, Stahmer I, Kloth S, Brandt E, Flad HD. Immunobiochemical and molecular biologic characterization of the cell proliferation-associated nuclear antigen that is defined by monoclonal antibody Ki-67. *Am J Pathol* 138: 867-873, 1991
51. Gil-Nagel A, Wilcox KJ, Stewart JM, Anderson VE, Leppik IE, Rich SS. Familial cerebral cavernous angiomas: clinical analysis of a family and phenotypic classification. *Epilepsy Res* 21: 27-36, 1995
52. Giombini S, Morello G. Cavernous angiomas of the brain. Account of fourteen personal cases and review of the literature. *Acta Neurochir* 40: 61-82, 1978
53. Gospodarowicz D, Abraham JA, Schilling J. Isolation and characterisation of a vascular endothelial cell mitogen produced by pituitary-derived folliculo stellate cells. *Proc Natl Acad Sci USA* 86: 7311-7315, 1989
54. Gross L. *Oncogenic Viruses*, ed 2. Oxford. Pergamon Press: 651-750, 1970
55. Günel M, Awad IA, Anson J, Lifton RP. Mapping a gene causing cerebral cavernous malformation to 7q11.2-q21. *Proc Natl Acad Sci USA* 92: 6620-6624, 1995
56. Günel M, Awad IA, Finberg K, Anson JA, Steinberg GR, Batjer PH, Kopitnik TA, Morrison L, Gianotta SL, Nelson Williams C, Lifton RP. A founder mutation as a cause of cerebral cavernous malformation in Hispanic Americans. *N Engl J Med* 334: 946-951, 1996
57. Hahn M. Kavernome des zentralen Nervensystems. 111 eigene Fälle und Metaanalyse von 1361 Literaturfällen. Medical thesis. University of Heidelberg, Germany, 1999
58. Hall PA, Levison DA, Woods AL, Yu CCW, Kellock DB, Watkins JA, Barnes DM, Gillett CE, Camplejohn R, Dover R, Waseem NH, Lane DP. Proliferating cell nuclear antigen (PCNA) Immunolocalization in paraffin sections: an index of cell proliferation with evidence of deregulated expression in some neoplasms, *J Pathol* 162: 285-94, 1990
59. Hall PA, Woods AL. Immunohistochemical markers of cellular proliferation: achievements, problems and prospects. *Cell Tissue Kinet* 23: 505-522, 1990
60. Harrison MJ, Eisenberg MB, Ullmann JS, Oppenheim JS, Camins MB, Post KD. Symptomatic cavernous malformations affecting the spine and spinal cord. *Neurosurgery* 37: 195-204, 1995
61. Hashimoto T, Emala CW, Joshi S, Mesa-Tejada R, Quick CM, Feng L, Libow A, Marchuk DA, Young WL. Abnormal Pattern of Tie-2 and Vascular Endothelial Growth Factor Receptor Expression in Human Cerebral Arteriovenous Malformations. *Neurosurgery* 47: 910-918, 2000
62. Hayman LA, Evans RA, Ferrel RE, Fahr LM, Ostrow P, Riccardi VM. Familial cavernous angiomas : natural history and genetic study over a 5-year period. *Am J Med Genetics* 11: 147-160, 1982
63. Herter T, Brandt M, Szüwart U. Cavernous hemangiomas in children. *Childs Nerv Syst* 4: 123-127, 1988
64. Hsu FPK, Rigamonti D, Huhn SL. Epidemiology of cavernous malformations. In: Awad IA, Barrow DL (eds) *Cavernous malformations*. AANS, Park Ridge, pp13-23, 1993

-
65. Jain R, Robertson PL, Gandhi D, Gujar SK, Muraszko KM, Gebarski S. Radiation-induced cavernomas of the brain. *AJNR Am J Neuroradiol* 26: 1158-1162, 2005
 66. Jakeman LB, Winter J, Bennett GL. Binding sites for vascular endothelial growth factor are localized on endothelial cells in adult rat tissues. *J Clin Invest* 89: 244-253, 1992
 67. Jin KL, Mao XL, Nagayama T, Goldsmith PC, Greenberg DA. Induction of vascular endothelial growth factor and hypoxia-inducible factor-1 α by global ischemia in rat brain. *Neuroscience* 99: 577-585, 2000
 68. Johnson EW, Iyer LM, Rich SS, Orr HT, Gil-Nagel A, Kurth JH, Zambramski JM, Marchuk DA, Weissenbach J, Clericuzio CL, Davis LE, Hart BL, Gusella JF, Kosofsky BE, Louis DN, Morrison LA, Green ED, Weber JL. Refined localisation of the cerebral cavernous malformation gene (CCM1) to a 4-cM interval of chromosome 7q contained in a well-defined YAC Contig. *Genome Research* 5: 368-380, 1995
 69. Jónsson ZO, Hindges R, Hübscher U. Regulation of DNA replication and repair proteins through interaction with the front side of proliferating cell nuclear antigen. *EMBO J* 17, 2412-2425, 1998
 70. Karlsson B, Kihlström L, Lindquist C, Ericson K, Steiner L. Radiosurgery for cavernous malformations. *J Neurosurg* 88: 293-297, 1998
 71. Keck PJ, Hauser SD, Krivi G, Sanzo K, Warren T, Feder J, Connolly DT. Vascular permeability factor, an endothelial cell mitogen related to PDGF. *Science* 246: 1309-1312, 1989
 72. Kilic T, Pamir N, Küllü S, Eren F, Özek MM, Black PM. Expression of structural proteins and angiogenic factors in cerebrovascular anomalies. *Neurosurgery* 46: 1179-1192, 2000
 73. Kirkegaard LJ, DeRose P, Yao B, Cohen C. Image Cytometric measurement of nuclear proliferation markers (MIB-1, PCNA) in astrocytomas. *Anatomic Path* 109: 69-74, 1998
 74. Kondziolka D, Lunsford LD, Kestle JRW. The natural history of cerebral cavernous malformations. *J Neurosurg* 83: 820-824, 1995
 75. Kubbutat MH, Cattoretti G, Gerdes J, Key G. Comparison of monoclonal antibodies PC10 and MIB1 on microwave-processed paraffin sections. *Cell Prolif* 27: 553-559, 1994a
 76. Kubbutat MH, Key G, Duchrow M, Schlüter C, Flad HD, Gerdes J. Epitope analysis of antibodies recognising the cell proliferation associated nuclear antigen previously defined by the antibody Ki-67 (Ki-67 Protein). *J Clin Pathol* 47: 524-528, 1994b
 77. Labauge P, Enjolras O, Bonerandi JJ, Laberge S, Dandurand M, Joujoux JM, Tournier-Lasserre E. An association between autosomal dominant cerebral cavernomas and a distinctive hyperkeratotic cutaneous vascular malformation in 4 families. *Ann Neurol* 45: 250-254, 1999
 78. Lange SC, Neafsey EJ, Wyler AR. Neuronal activity in chronic ferric chloride epileptic foci in cats and monkey. *Epilepsia* 21: 251-254, 1980
 79. Larson JJ, Ball WS, Bove KE, Crone KR, Tew Jr JM. Formation of intracerebral cavernous malformations after radiation treatment for central nervous system neoplasia in children. *J Neurosurg* 88: 51-56, 1998
 80. Lee KS, Spetzler RF. Spinal cord cavernous malformation in a patient with familial intracranial cavernous malformations. *Neurosurgery* 26: 877-880, 1990

81. Lejeune JP, Combelles G, Christiaens JL. Formes familiales des cavernomes. *Neurochirurgie* 35: 111-112, 1989
82. Leu HJ. Pathomorphology of vascular malformations. *Int Angiol* 9: 147-54, 1990
83. Leung DW, Cachianes G, Kuang WJ, Goeddel DV, Ferrara N. Vascular endothelial growth factor is a secreted angiogenetic mitogen. *Science* 246: 1306-1309, 1989
84. Little JR, Awad IA, Jones SC, Ebrahim ZY. Vascular pressures and cortical blood flow in cavernous angioma of the brain. *J Neurosurg* 73: 555-559, 1990
85. Lunsford LD, Kondziolka D, Flickinger JC, Bissonette DJ, Jungreis CA, Maitz AH, Horton JA, Coffey RJ. Stereotactic radiosurgery for arteriovenous malformations of the brain. *J Neurosurg* 75: 512-24, 1991
86. Malek A, Lee I, Izumo S, Alper S. Identification of vascular endothelial growth factor (VEGF) as a flow-regulated mediator of angiogenesis. *Neurosurgery* 47: 499-500, 2000
87. Maraire JN, Awad IA. Intracranial cavernous malformations : lesion behavior and management strategies. *Neurosurgery* 37: 591-605, 1995
88. Maraire JN, Abdulrauf SI, Berger S, Knisely J, Awad IA. De novo development of cavernous malformation of the spinal cord following spinal axis radiation. Case report. *J Neurosurg* 90: 234-238, 1999
89. Marchuk DA, Gallione CJ, Morrison LA, Clericuzio CL, Hart BL, Kosofski BE, Louis DN, Gusella JF, Davis LE, Prenger VL. A locus for cerebral cavernous malformations maps to chromosome 7q in 2 families. *Genomics* 28: 311-314, 1995
90. Marti HJ, Bernaudin M, Bellail A, Schoch H, Euler M, Petit E, Risau W. Hypoxia-induced vascular endothelial growth factor expression precedes neovascularization after cerebral ischemia. *Am J Pathol* 156: 965-976: 2000
91. Matsubara S, Bordeau A, terBrugge KG, Wallace C, Letarte M. Analysis of endoglin expression in normal brain tissue and in cerebral arteriovenous malformations. *Stroke* 31: 2653-2660, 2000
92. Mazza C, Scienza R, Beltramello A, Da Pian R. Cerebral cavernous malformations (cavernomas) in the pediatric age-group. *Childs Nerv Syst* 7: 139-146, 1991
93. McCormick D, Hall PA. The complexities of proliferating cell nuclear antigen. *Histopathology* 21: 591-594, 1992
94. McCormick WF. The pathology of vascular ("arteriovenous") malformations. *J Neurosurg* 24: 807-816, 1966
95. McCormick WF, Hardman JM, Boulter TR. Vascular malformations ("angiomas") of the brain, with special reference to those occurring in the posterior fossa. *J Neurosurg* 28: 241-251, 1968
96. McCormick WF. Pathology of vascular malformations of the brain, in Wilson CB, Stein BM: *Intracranial arteriovenous malformations*. Baltimore, Williams&Wilkins 44-63, 1984
97. McInnis MG. Anticipation: an old idea in new genes. *Am J Hum Genet* 59: 973-979, 1996
98. Millauer B, Witzigmann-Voos S, Schnürch H, Martinez R, Möller NP, Risau W, Ullrich A. High affinity VEGF binding and developmental expression

-
- suggest Flk-1 as a major regulator of vasculogenesis and angiogenesis. *Cell* 72: 835-846, 1993
99. Mitchell P, Hodgson TJ, Seaman S, Kemeny AA, Forster DMC. Stereotactic radiosurgery and the risk of hemorrhage from cavernous malformations. *Br J Neurosurg* 14: 96-100, 2000
 100. Moriarity JL, Wetzel M, Clatterbuck RE, Javedan S, Sheppard J-M, Hoenig-Rigamonti K, Crone NE, Breiter SN, Lee RR, Rigamonti D. The natural history of cavernous malformations: A prospective study of 68 patients. *Neurosurgery* 44: 1166-1173, 1999
 101. Mottolise C, Hermier M, Stan H, Jouvet A, Saint-Pierre G, Froment J-C, Bret P, Lapras C. Central nervous system cavernomas in the pediatric age group. *Neurosurg Rev* 24: 55-71, 2001
 102. Notelet L, Chapon F, Khoury S, Vahedi K, Chodkiewicz JP, Courtheoux P, Iba-Zizen MT, Cabanis EA, Lechevalier B, Tournier-Lasserre E, Houtteville JP. Familial cavernous malformations in a large French kindred: mapping of the gene to the CCM1 locus on chromosome 7q. *J Neurol Neurosurg Psychiatry* 63: 40-45, 1997a
 103. Notelet L, Houtteville JP, Khoury S, Lechevalier B, Chapon F. Proliferating cell nuclear antigen (PCNA) in cerebral cavernomas: an immunohistochemical study of 42 cases. *Surg Neurol* 47: 364-370, 1997b
 104. Noto S, Fujii M, Akimura T, Imoto H, Nomura S, Kajiwara K, Kato S, Fujisawa H, Suzuki M. Management of patients with cavernous angiomas presenting seizures. *Surg Neurol* 64: 495-498, 2005
 105. Oelrichs RB, Reid HH, Bernard O, Ziemieki A, Wilks AF. NYK/FLK-1: a putative receptor protein tyrosine kinase isolated from E10 embryonic neuroepithelium is expressed in endothelial cells of the developing embryo. *Oncogene* 8: 11-18, 1993
 106. Pagni CA, Canavero S, Forni M. Report of a cavernoma of the cauda equina and review of the literature. *Surg Neurol* 33: 124-131, 1990
 107. Peters KG, De Vries C, Williams LT. Vascular endothelial growth factor receptor expression during embryogenesis and tissue repair suggests a role in endothelial differentiation and blood vessel growth. *Proc Natl Acad Sci USA* 90: 8915-8919, 1993
 108. Plate KH, Breier G, Weich HA, Risau W. Vascular endothelial growth factor is a potential tumour angiogenesis factor in human gliomas in vivo. *Nature* 359: 845-848, 1992
 109. Plate KH, Breier G, Millauer B, Ullrich A, Risau W. Up-regulation of vascular endothelial growth factor and its cognate receptors in a rat glioma model of tumor angiogenesis. *Cancer Research* 53: 5822-5827, 1993
 110. Plate KH. Mechanisms of angiogenesis in the brain. *J Neuropathol Exp Neurol* 58: 313-320, 1999
 111. Pollock BE, Garces YI, Stafford SL, Foote RL, Schomberg PJ, Link MJ. Stereotactic radiosurgery for cavernous malformations. *J Neurosurg* 93: 987-991, 2000
 112. Polymeropoulos MH, Hurko O, Hsu F, Rubenstein J, Basnet S, Lane K, Dietz H, Spetzler RF, Rigamonti D. Linkage of the locus for cerebral cavernous hemangiomas to human chromosome 7q in four families of Mexican-American descent. *Neurology* 48: 752-757, 1997

-
113. Porter PJ, Willinsky RA, Harper W, Wallace MC. Cerebral cavernous malformations: natural history and prognosis after clinical deterioration with or without hemorrhage. *J Neurosurg* 87: 190-197, 1997
 114. Porter RW, Detwiler PW, Spetzler RF, Lawton MT, Baskin JJ, Derksen PT, Zabramski JM. Cavernous malformations of the brainstem: experiences with 100 patients. *J Neurosurg* 90: 50-58, 1999
 115. Pozzati E, Padovani R, Morrone B, Finizio F, Gaist G. Cerebral cavernous angiomas in children. *J Neurosurg* 53: 826-832, 1980
 116. Pozzati E, Acciarri N, Tognetti F, Marliani F, Giangaspero F. Growth, subsequent bleeding, and de novo appearance of cerebral cavernous angiomas. *Neurosurgery* 38: 662-670, 1996a
 117. Pozzati E, Giangaspero F, Marliani F, Acciarri N. Occult cerebrovascular malformation after irradiation. *Neurosurg* 39: 677-684, 1996b
 118. Prelich G, Tan CK, Kostura M, Mathews MB, So AG, Downey KM, Stillman B. Functional identity of proliferating cell nuclear antigen and DNA polymerase-delta auxiliary protein. *Nature* 326: 517-520, 1987
 119. Reid SA, Sybert GW, Boggs WM. Histopathology of the ferric-induced chronic epileptic focus in cat: a Golgi study. *Exp Neurol* 66: 205-219, 1979
 120. Rigamonti D, Drayer BP, Johnson PC, Hadley MN, Zabramski J, Spetzler RF. The MRI appearance of cavernous malformations (angiomas). *J Neurosurg* 67: 518-524, 1987
 121. Rigamonti D, Hadley MN, Drayer BP, Johnson PC, Hoenig-Rigamonti K, Knight JT, Spetzler RF. Cerebral cavernous malformations. Incidence and familial occurrence. *The New England J of Medicine* 319: 343-347, 1988
 122. Rigamonti D, Spetzler RF. The association of venous and cavernous malformations. Report of four cases and discussion of the pathophysiological, diagnostic and therapeutic implications. *Acta Neurochir (Wien)* 92: 100-105, 1988
 123. Rigamonti D, Johnson PC, Spetzler RF, Hadley MN, Drayer BP. Cavernous malformations and capillary teleangiectasia: a spectrum within a single pathological entity. *Neurosurgery* 28: 60-64, 1991
 124. Robinson JR, Awad IA, Little JR. Natural history of the cavernous angioma. *J Neurosurg* 75: 709-714, 1991
 125. Robinson JR, Awad IA. Clinical spectrum and natural course. In: Awad JR, Barrow DL (eds). *Cavernous malformations*. AANS, Park Ridge: 25-36, 1993
 126. Robinson JR Jr, Awad IA, Magdinec M. Factors predisposing to clinical disability in patients with cavernous malformations of the brain. *Neurosurgery* 32: 730-736, 1993
 127. Rosahl SK, Vorkapic P, Eghbal R, Ostertag H, Samii M. Ossified and de novo cavernous malformation in the same patient. *Clin Neur and Neurosurg* 100: 138-143, 1998
 128. Rose DSC, Maddox PH, Brown DC. Which proliferation markers for routine immunohistology? A comparison of five antibodies. *J Clin Pathol* 47: 1010-1014, 1994
 129. Rosenstein JM, Mani N, Silverman WF, Krum JM. Patterns of brain angiogenesis after vascular endothelial growth factor administration in vitro and in vivo. *Proc Natl Acad Sci* 95: 7086-7091, 1998
 130. Runnels JB, Gifford DB, Forsberg PL. Dense calcification in a large cavernous angioma. Case report. *J Neurosurg* 30: 293-298, 1969

131. Russel DS, Rubinstein LJ. Pathology of tumours of the nervous system. Baltimore, Williams&Wilkins ed 4, 116-145, 1977
132. Sage MR, Brophy BP, Sweeney C, Phipps S, Perrerr LV, Sandhu A, Albertin LE. Cavernous haemangiomas (angiomas) of the brain: clinically significant lesions. *Australas Radiol* 37: 147-155, 1993
133. Sarzani R, Brecher B, Chobanian AB. Growth factor expressions in aorta of normotensive and hypertensive rats. *J Clin Invest* 83: 1404-1408, 1989
134. Sasaki K, Murakami T, Kawasaki M, Takahashi M. The cell cycle associated change of the Ki67 reactive nuclear antigen expression. *J Cell Phsiol* 133: 579-584, 1987
135. Savoiardo M, Strada L, Passerini A. Intracranial cavernous hemangiomas: Neuroradiologic review of 36 operated cases. *AJNR* 4: 945-950, 1983
136. Sawhney N, Hall PA. Ki-67-structure, function, and new antibodies. *J Pathol* 168: 161-162, 1992
137. Schlüter C, Duchrow M, Wohlenberg C, Becker MHG, Key G, Flad HD, Gerdes J. The cell proliferation-associated antigen of antibody Ki-67: A very large, ubiquitous nuclear protein with numerous repeated lements, representing a new kind of cell cycle-maintaining proteins. *J Cell Biol* 123, 513-522, 1993
138. Scott BB, Seeger JF, Schneider RC. Succesfull evacuation of a pontine hematoma secondary to rupture of a pathologically diagnosed "cryptic" vascular malformation. Case report. *J Neurosurg* 39: 104-108, 1973
139. Scott RM, Barnes P, Kupsky W, Adelman LS. Cavernous angiomas in the central nervous system in children. *J Neurosurg* 76: 38-46, 1992
140. Semenza GL. Hypoxia-inducible factor 1: a master regulator of O2 homeostasis. *Curr Opin Genet Dev* 8: 588-594, 1998
141. Shweiki D, Itin A, Soffer D, Keshet E. Vascular endothelial growth factor induced by hypoxia may mediate hypoxia-initiated angiogenesis. *Nature* 359: 843-845, 1992
142. Siegel AM. Familial cavernous angioma: an unknown, known disease. *Acta Neurol Scand* 98: 369-371, 1998
143. Siegel AM, Andermann F, Badhwar A, Rouleau GA, Dam M, Hopf HC, Dichgans J, Sturzenegger M, Hopf NJ, Yasui N, Stepper F, Killer M, Vanneste JAL, Acciari N, Drigo P, Christensen J, Braun V, Könü D, Andermann E. Anticipation in familial cavernous angioma: ascertainment bias or genetic course. *Acta Neurol Scand* 98: 372-376, 1998a
144. Siegel AM, Andermann E, Badhwar A, Rouleau GA, Wolford GL, Andermann F, Hess K. Anticipation in familial cavernous angioma: a study of 52 families from International Familial Cavernous Angioma Study. *Lancet* 352: 1676, 1998b
145. Simard JM, Garcia-Bengochea F, Ballinger WE Jr, Mickle JP, Quisling RG. Cavernous angioma: a review of 126 collected and 12 new clinical cases. *Neurosurgery* 18: 162-172, 1986
146. Smetana K, Gyorkey F, Chan PK, Tan CE, Busch H. Proliferating cell nuclear antigen (PCNA) and human malignant nucleolar antigens (HMTNA) in nucleoli of human haematologica malignancies. *Blut* 46: 133-141, 1983
147. Steichen-Gersdorf E, Felber S, Fuchs W, Russeger L, Twerdy K. Familial cavernous angiomas of the brain: observation in a four generation family. *Eur J Pediatr* 151: 861-863, 1992

148. Sure U, Rüedi D, Tachibana O, Yonekawa Y, Ohgaki H, Kleihues P, Hegi ME: Determination of p53 mutations, EGFR overexpression, and loss of p16 expression in pediatric glioblastoma. *J Neuropathol Experiment Neurol* 56: 782-789, 1997
149. Sure U, Becker R, Petermeyer M, Bertalanffy H. Aneurysm of the posterior inferior cerebellar artery caused by a traumatic perforating artery tear-out mechanism in a child. *Childs Nerv Syst* 15: 351-354, 1999
150. Sure U, Butz N, Schlegel J, Bien S, Bertalanffy H. Growth and potential de novo generation of cerebral vascular malformations: incomplete embolisation of cerebral AVMs leads to neoangiogenesis. *Neurosurgery* 47: 533-534, 2000a
151. Sure U, Wakat JP, Gatscher S, Becker R, Bien S, Bertalanffy H. Spinal type IV arteriovenous malformations (perimedullary fistulas) in children. *Childs Nerv Syst* 16: 508-15, 2000b
152. Sure U, Butz N, Schlegel J, Siegel A, Mennel HD, Bien S, Bertalanffy H. Endothelial proliferation, neoangiogenesis and potential de novo generation of cerebral vascular malformations. *J Neurosurg* 94: 972-977, 2001a
153. Sure U, Butz N, Siegel AM, Mennel HD, Bien S, Bertalanffy H. Treatment-induced neoangiogenesis in cerebral arteriovenous malformations. *Clin Neurol Neurosurg* 103: 29-32, 2001b
154. Sure U. Endothelzellproliferation und Neoangiogenese cerebraler arteriovenöser Malformationen und ihre klinische Bedeutung. Medizinische Habilitationsschrift, Marburg, 2002
155. Sure U, Freman S, Bozinov O, Benes L, Siegel AM, Bertalanffy H. Biological activity of adult cavernous malformations: a study of 56 patients. *J Neurosurg* 102: 342-347, 2005
156. Terman BI, Dougher Vermazen M, Carrion ME, Dimitrov D, Armellino DC, Gospodarowicz D, Bohlen P. Identification of the KDR tyrosine kinase as a receptor for vascular endothelial growth factor. *Biochem Biophys Res Commun* 187: 1579-86, 1992
157. Tirakotai W, Fremann S, Soerensen N, Roggendorf W, Siegel AM, Mennel HD, Zhu Y, Bertalanffy H, Sure U. Biological activity of paediatric cerebral cavernomas: an immunohistochemical study of 28 patients. *Childs Nerv Syst* 22: 685-691, 2006
158. Tomlinson FH, Houser OW, Scheithauer BW, Sundt TM, Okazaki H, Parisi JE. Angiographically occult vascular malformations: a correlative study of features on magnetic resonance imaging and histological examination. *Neurosurgery* 34: 792-800, 1994
159. Uranishi R, Baev NI, Ng P-Y, Kim JH, Awad IA. Expression of Endothelial Cell Angiogenesis Receptors in Human Cerebrovascular Malformations. *Neurosurgery* 48: 359-367, 2001
160. Vandeputte M. Antilymphocytic serum and polyoma oncogenesis in rats. *Transplant Proc* 1: 100-105, 1969
161. Van Dierendonck JH, Keijzer R, Van de Velde CJH, Cornelisse CJ. Nuclear distribution of the Ki67 antigen during the cell cycle: comparison with growth fraction in human breast cancer cells. *Cancer Res* 49: 2999, 1989
162. Vaquero J, Leunda G, Martinez R, Bravo G. Cavernomas of the brain. *Neurosurgery* 12: 208-210, 1983

-
163. Vaquero J, Salazar J, Martinez R, Martinez P, Bravo G. Cavernomas of the central nervous system: clinical syndroms, CT scan diagnosis, and prognosis after surgical treatment in 25 cases. *Acta Neurochir (Wien)* 85: 29-33, 1987
 164. Vartanian RK, Weidner N. Correlation of intratumoral endothelial cell proliferation with microvessel density (tumor angiogenesis) and tumor cell proliferation in breast carcinoma. *Am J Pathol* 144: 1188-1194, 1994
 165. Verheijen R, Kuijpers HJ, Schlingemann RO, Boehmer AL, Van Driel R, Brakenhoff GJ, Ramaekers FC. Ki67 detects a nuclear matrix-associated proliferation-related antigen. I. Intracellular localisation during interphase. *J Cell Sci* 92: 123-130, 1989a
 166. Verheijen R, Kuijpers HJ, Van Driel R, Beck JL, Van Dierendonck JH, Brakenhoff GJ, Ramaekers FC. Ki67 detects a nuclear matrix-associated proliferation-related antigen. II. Localisation in mitotic cells and association with chromosomes. *J Cell Sci* 92: 531-540, 1989b
 167. Viskula M, Boon LM, Carraway KL, Calvert JT, Diamonti AJ, Goumnerov B, Pasyk KA, Marchuk DA, Warman ML, Cantley LC, Mulliken JB, Olsen BR. Vascular dysmorphogenesis caused by an activating mutation in the receptor tyrosine kinase tie2. *Cell* 87: 1181-1190, 1996
 168. Voigt K, Yasargil MG. Cerebral cavernous haemangiomas or cavernomas. Incidence, pathology, localization, diagnosis, clinical features and treatment. Review of the literature and report of an unusual case. *Neurochirurgia Stuttg* 19: 59-68, 1976
 169. Wersto RP, Herz F, Gallagher RE, Koss LG. Cell cycle dependent reactivity with the monoclonal antibody Ki67 during myeloid differentiation. *Exp Cell Res* 179: 79, 1988
 170. Wilkins RH. Natural history of intracranial vascular malformations: a review. *Neurosurgery* 16: 421-430, 1985
 171. Willmore LJ, Sybert GW, Munson JB. Recurrent seizures induced by cortical iron injection: a model of posttraumatic epilepsy. *Ann Neurol* 4: 329-336, 1978
 172. Witzigmann-Voos S, Breier G, Risau W, Plate KH. Up-regulation of vascular endothelial growth factor and its receptors in von Hippel-Lindau disease-associated and sporadic hemangioblastomas. *Cancer Res* 55: 1358-1364, 1995
 173. Wolf HK, Dittrich KL. Detection of proliferating cell nuclear antigen in diagnostic histopathology. *J Histochem Cytochem* 40: 1269-73, 1992
 174. Yancopoulos GD, Davis S, Gale NW, Rudge JS, Wiegand SJ, Holash J. Vascular specific growth factors and blood vessel formation. *Nature* 407: 242-248, 2000
 175. Zambramski JM, Wascher TM, Spetzler RF, Johnson B, Golfinos J, Drayer BP, Brown B, Rigamonti D, Brown G. The natural history of familial cavernous malformations: results of an ongoing study. *J Neurosurg* 80: 422-432, 1994
 176. Zevgaridis D, Medele RJ, Hamburger C, Steiger H-J, Reulen H-J. Cavernous haemangiomas of the spinal cord. A review of 117 cases. *Acta Neurochir (Wien)* 141: 237-245, 1999
 177. Zimmerman RS, Spetzler RF, Lee KS, Zambramski JM, Hardgraves RW. Cavernous malformations of the brain stem. *J Neurosurg* 75: 32-39, 1991

7 Verzeichnis der akademischen Lehrer

Meine akademischen Lehrer waren Damen/Herren in Marburg

Arnold	Hofmann	Mutters
Aumüller	Hoyer	Neubauer
Barth	Junclas	Oertel
Basler	Kalder	Printz
Baum	Kaluza	Ramaswamy
Becker	Kann	Remschmidt
Benes	Klaus	Renz
Bertalanffy	Klenk	Richter
Bien	Klose	Roeßler
Cetin	Köhler	Röhm
Czubayko	König	Rosenow
Daut	Koolmann	Rothmund
Dick	Kretschmer	Schäfer
Duda	Krieg	Schmidt
Eberhart	Kroh	Schnabel
Eilers	Kuhlmann	Schüffel
Engenhardt-Cabillic	Kühnert	Schultz
Feuser	Lemke	Seitz
Geks	Leonhardt	Steiniger
Gemsa	Lill	Stiletto
Gerdes	Löffler	Sure
Görg	Maier	Vogelmaier
Gotzen	Maisch	Wagner
Groß	Martin	Weihe
Gudermann	Max	Werner
Happle	Mennel	Westermann
Hasilik	Mittag	Wulf
Hellwig	Moll	Zwiorek
Hertl	Moosdorf	
Höffken	Mueller	

8 Danksagung

Für die freundliche Überlassung des sehr interessanten Themas möchte ich an dieser Stelle Prof. Dr. Helmut Bertalanffy, Direktor der Neurochirurgischen Klinik der Philipps-Universität Marburg, danken.

Mein ganz besonderer Dank gilt PD Dr. Ulrich Sure (Klinik für Neurochirurgie der Philipps-Universität Marburg), der diese Arbeit angeregt und betreut hat, für seine Geduld und Ausdauer und für seine konstruktive Kritik, die maßgeblich zum Gelingen der Arbeit beigetragen hat.

Ebenso danke ich Prof. Dr. H.D. Mennel (ehem. Leiter der Abteilung für Neuropathologie im Zentrum für Pathologie der Philipps-Universität Marburg) für die Möglichkeit in seiner Abteilung Teile der Laborarbeit durchführen zu können, für den Beitrag der Kontrollpräparate aus 14 adulten Sektionen und für die Fotodokumentation der dargestellten Präparate.

Ich bedanke mich bei Prof. Dr. Adriano Aguzzi (Abteilung für Neuropathologie der Universitätsklinik Zürich) und Prof. Dr. Sebastian Brandner (seinerzeit Oberarzt in der Abteilung für Neuropathologie der Universitätsklinik Zürich, jetzt Consultant Neuropatholog. Queen Square London) für die freundliche Zurverfügungstellung von Präparaten aus fünf pädiatrischen Autopsien.

Für den freundlichen Beitrag von 16 pädiatrischen und adulten Fällen inklusive der zugehörigen klinischen Patientendaten danke ich Dr. A. M. Siegel (Klinik für Neurologie der Universität Zürich).

Ferner danke ich Prof. Dr. N. Soerensen (Klinik für pädiatrische Neurochirurgie der Julius-Maximilians Universität Würzburg) und Prof. Dr. W. Roggendorf (Abteilung für Neuropathologie der Julius-Maximilians Universität Würzburg) für den Beitrag von 23 pädiatrischen Fällen zur vorliegenden Studie.

Den technischen Assistentinnen der Klinik für Neurochirurgie und der Abteilung für Neuropathologie danke ich ganz herzlich dafür, dass sie mich bei den Laborarbeiten mit Hilfestellung und Rat unterstützt haben, und dass sie mich so freundlich in die Laborgemeinschaft aufgenommen haben.

Frau Astrid Dempfle (Institut für medizinische Biometrie und Epidemiologie der Philipps-Universität Marburg) danke ich für ihre Beratung und Unterstützung bei der statistischen Aufarbeitung der Studienergebnisse.

Mein besonders herzlicher Dank gilt meiner gesamten Familie. Meinem Vater Josef Niemann danke ich sehr für seine geduldige Unterstützung in Rechtschreibungs- und Interpunktionsfragen.

Ein letzter ganz besonderer Dank kommt meinem Ehemann Andreas zu, der maßgeblich zum Erfolg dieser Arbeit beigetragen hat, indem er immer an mich und diese Doktorarbeit geglaubt hat, mich motiviert hat und mich unzählige Stunden von meinen familiären Pflichten mit unseren beiden Kindern entlastet hat.